

**RADIOIMMUNDARSTELLUNG EXPERIMENTELLER GLIOME
MITTELS RADIOAKTIV MARKIERTER
MONOKLONALER ANTIKÖRPER**

HUBERT GLÄSSNER

1986

Disbui. München





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Nuklearbiologie der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung m.b.H. München
Leiter: Prof. Dr. H. Kriegel

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Radioimmundarstellung experimenteller Gliome
mittels radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Hubert Glässner
aus
Teisendorf

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

INHALTSÜBERSICHT

Seite

A. EINLEITUNG	4
B. LITERATURÜBERSICHT	
I. Charakterisierung gliomassoziiierter Antigene mittels monoklonaler Antikörper	6
II. Radioaktive Markierung von Antikörpern	8
III. Radioimmunszintigraphie von Tumoren	12
1. Einsatz polyklonaler Antikörper zur Immunszintigraphie	12
2. Einsatz monoklonaler Antikörper zur Immunszintigraphie	14
3. Radioimmundarstellung von Tumoren des Zentralnervensystems	17
C. PROBLEMSTELLUNG	19
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	20
I. Material und Methoden	20
1. Versuchstiere	20
2. Zellmaterial	20
2.1. Zellkulturen	20
2.1.1. Permanente Gliomzelllinien	20
2.1.2. Hybridomzellen	21
2.1.3. Mäuseperitonealzellen	22
2.1.4. Hirnzellkulturen	22
3. Nachweis der Bindungsspezifität	23
3.1. Micro-ELISA	23
3.2. Indirekte Immunperoxidasefärbung	24

	Seite
4. Konservieren von Zellen und Hybridomprodukten	25
4.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
4.1.1. Einfrieren in Kryotubes	25
4.1.2. Einfrieren in Platten	25
4.1.3. Auftauen von Zellen	26
4.2. Konservierung und Lagerung von Hybridomprodukten	26
5. Gewinnung und Reinigung monoklonaler Antikörper	27
5.1. Ascitesgewinnung	27
5.2. Ammoniumsulfatpräzipitation	28
5.3. Protein-A-Sepharose-Säule	28
6. Charakterisierung monoklonaler Antikörper	29
6.1. Agargel-Immunodiffusion	29
6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
7. Pepsinspaltung monoklonaler Antikörper	32
8. Radioaktive Markierung von Antikörpern mit Jod-131	33
8.1. Chloramin-T-Methode	33
8.2. Jodogen-Methode	34
9. In vitro-Untersuchungen an J 131-markierten Antikörpern	34
9.1. Dünnschichtchromatographie	34
9.2. Zellautoradiographie	35
9.3. Absorptionsversuche	35
10. Szintigraphische Darstellung von Gliomtransplantaten	36
10.1. Tumortransplantationen	36
10.2. Applikation jodmarkierter Antikörper	37
10.3. Externe Szintigraphie	38
11. Biokinetische Studien zur Verteilung und Elimination markierter Antikörper/Fragmente	39

	Seite
11.1. Ganzkörpermessungen	39
11.2. Verteilungsstudien	39
II. ERGEBNISSE	41
1. Hybridomzellkulturen (Klon 14 AC1)	41
2. Produktion monoklonaler Antikörper in vitro/in vivo	41
3. Konservieren von Zellen und Hybridomprodukten	42
4. Reinigung und Pepsinspaltung der Immun- globuline	43
5. Charakterisierung monoklonaler Antikörper und Fragmente	45
6. Radioaktive Markierung mit Jod-131	47
7. In vitro-Untersuchungen	51
7.1. Dünnschichtchromatographie	51
7.2. Zellautoradiographie/Absorptionsversuche	51
8. Szintigraphische Darstellung	52
8.1. Intakte Antikörper	52
8.2. Antikörper-Fragmente	57
8.3. Beeinflussung der Tumordarstellung durch Vorinjektion von nichtradioaktiven monoklo- nalen Antikörpern	58
9. Ganzkörpermessungen	61
10. Verteilungsstudien	63
10.1. Verteilungsverhalten intakter Antikörper	63
10.2. Verteilung von Antikörperfragmenten	67
10.3. Intracerebrale Transplantate	69
E. DISKUSSION	73
F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	84
G. LITERATURVERZEICHNIS	88

A. EINLEITUNG

Die Darstellung tumorassoziiierter Antigene spontaner und experimentell induzierter Tumoren durch Nachweis humoraler und zellulärer Immunreaktionen war lange Zeit Gegenstand ausgedehnter Untersuchungen um Grundlagen für mögliche immundiagnostische, wie immuntherapeutische Anwendungen zu schaffen. In den letzten 10 Jahren, nach Entwicklung der Hybridomtechnologie durch Köhler und Milstein (1975), bestand zunehmendes Interesse am Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper zur Radioimmundiagnostik und Immuntherapie von Tumoren, die durch herkömmliche Methoden unzureichend erfasst werden konnten und die sich gegenüber konventionellen therapeutischen Maßnahmen als besonders resistent erwiesen (Keenan et al., 1985).

Die grundlegenden Untersuchungen zur Anwendung isotope-markierter Antikörper wurden von Pressman et al. (1948) durchgeführt. In Versuchen mit polyklonalen jodmarkierten Antikörpern gegen Nierengewebe konnten nach Applikation in vivo hohe Aktivitäten in der Niere nachgewiesen werden. Bei Verwendung polyklonaler Antiseren aus immunisierten Versuchstieren als Trägermoleküle für Radioisotope und zytotoxische Substanzen zeigte sich aber auch deren eingeschränkte Spezifität, die auch nach aufwendigen Absorptionsschritten zur Elimination kontaminierender unspezifischer Begleitproteine nicht im gewünschten Maße gesteigert werden konnte. Erst mit monoklonalen Antikörpern, die in beliebigen Mengen mit einheitlicher Spezifität erzeugt werden können, wurden die Voraussetzungen für die Entwicklung diagnostischer Verfahren geschaffen.

Maligne Tumoren des Zentralnervensystems, speziell anaplastische Gliome, gehören trotz chirurgischer Maßnahmen, Chemotherapie und Bestrahlung zu den prognostisch ungünstigsten Tumoren (Mahaley, 1972; Walker et al., 1978).

Zusätzlich stellen neurogene Tumoren hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenheiten und ihrer Lokalisation im Gehirn mit seinem besonderen Immunstatus (Aarli, 1983) einen Sonderfall unter den Tumoren dar. Das Vorhandensein von tumorassoziierten antigenen Determinanten als Voraussetzung für erfolgreiche Immunlokalisation und Therapie wurde sowohl bei Gliomen des Menschen, als auch bei chemisch induzierten Hirntumoren der Ratte durch weitreichende Untersuchungen bestätigt.

Die klinische Anwendung eines monoklonalen Antikörpers setzt abgesehen von seiner in vitro-Spezifität auch die Untersuchung seines in vivo-Verhaltens voraus. Speziell am Tumortransplantat der Nacktmaus lassen sich die pharmakokinetischen Eigenschaften eines monoklonalen Antikörpers einheitlicher Spezifität und definierter chemischer Struktur ermitteln (Mach et al., 1981). Diese Untersuchungen umfassen neben der grundsätzlichen Ermittlung der Tumoranreicherung eines isotopengekoppelten Antikörpers im Verhältnis zu anderen Geweben und Organen auch die Bestimmung der Stabilität des Antikörpers in vivo in Zusammenhang mit seinem Metabolisierungs- und Ausscheidungsverhalten.

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Charakterisierung gliomassoziielter Antigene mittels monoklonaler Antikörper

In Zusammenhang mit der Aufklärung der immunologischen Eigenschaften von Gliomen bildete der Nachweis der Expression gliomassoziielter Oberflächenantigene als Ausdruck einer malignen Transformation glialer Zelltypen einen Schwerpunkt vieler Untersuchungen. Angesichts der schlechten Therapierbarkeit fortgeschrittener Stadien dieser Tumorart galt das besondere Interesse der Entwicklung von immunologischen Diagnoseverfahren, sowie immuntherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten (Wikstrand et al., 1980). Zur Untersuchung der antigenen Eigenschaften menschlicher Gliome wurden anfangs polyklonale Heteroantisera aus immunisierten Versuchstieren eingesetzt, wobei aufwendige Absorptionsschritte nötig waren, um kontaminierende Begleitantikörper, die mit Gewebsantigenen des Menschen reagierten, zu entfernen (Coakham, 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977; Wikstrand et al., 1979; Schnegg et al., 1981a). Auch bei experimentellen Gliomen wurden Antigene, die zum Teil immunogene Eigenschaften aufwiesen, beschrieben (Trouillas, 1971; Tho et al., 1974; Stavrou et al., 1977; Spence et al., 1979; Morantz et al., 1979; Stavrou et al., 1980; Bilzer et al., 1982). Zusätzlich wurde auch die Immunantwort von Gliompatienten in Form humoraler wie zellvermittelter Immunreaktionen gegen die eigenen Tumorzellen näher untersucht (Wahlström et al., 1973; Kornblith et al., 1974; Woosley et al., 1977; Sheikh et al., 1977; Pfreundschuh et al., 1978; Coakham et al., 1980; Martin-Achard et al., 1980). Mit der Möglichkeit monoklonale Antikörper einer prädefinierten Spezifität in beliebiger Menge erzeugen zu können,

wurde eine neue Dimension im Studium tumorassoziierter Antigene eröffnet. Mittels monoklonaler Antikörper konnte eine genauere Charakterisierung und Klassifizierung von gliomassozierten Antigenen erfolgen. So wurden bei spontanen, wie experimentellen Gliomen antigene Determinanten beschrieben, die vorzugsweise auf der Zellmembran von Gliomzellen auftraten, im Gegensatz zur Gruppe von Differenzierungsantigenen, die sich auf neuroektodermalen Tumoren und auf fetalen Hirnzellen fanden (Kennet et al., 1979; Seeger et al., 1981; Schnegg et al., 1981b; Carrel et al., 1982; Wikstrand et al., 1982; Cairncross et al., 1982; Stavrou et al., 1983; Kemshead et al., 1983; Coakham, 1984). Viele der beschriebenen monoklonalen Antikörper zeigten jedoch auch Bindungsfähigkeit mit Tumoren anderer Gewebsarten, sowie mit normalen adultem Hirngewebe und reaktiven Gliazellen. Die für die Diagnostik und Immuntherapie besonders wichtige Frage nach der Existenz tumorspezifischer antigener Strukturen bei Gliomen konnte trotz weitreichender Untersuchungen bislang nicht geklärt werden (Allan et al., 1983; Coakham, 1984).

Maligne Gliome erweisen sich bei histologischer Untersuchung als sehr heterogene Tumoren. Diese Heterogenität konnte durch geno- und phänotypische Untersuchungen an kultivierten Gliomzellen, wie auch durch Studien der therapeutischen Sensitivität von Tumorzellsubpopulationen bestätigt werden (Bigner et al., 1981; Shapiro et al., 1981; Bigner et al., 1983). Durch Einsatz monoklonaler Antikörper ließ sich an klonierten Gliomzellen die qualitative wie quantitative Expression gliomassoziierter Oberflächenantigene näher charakterisieren (Wikstrand et al., 1983; Bourdon et al., 1983; Piquet et al., 1985).

In Hinblick auf die möglichen Nebenwirkungen, die mit einer Anwendung von Maus-Immunglobulinen am Menschen verbunden sein können, wurden auch Versuche unternommen, humane



Hybridome als Produzenten für monoklonale Immunglobuline zu etablieren. Sikora et al. (1982, 1984) gelang es durch Fusion von Lymphozyten aus operativ gewonnenem Gliommaterial mit Myelomzellen des Menschen Hybridome zu kultivieren, die humane monoklonale Antikörper mit hoher Spezifität für Gliomzellen produzierten.

II. Radioaktive Markierung von Antikörpern

Die erfolgreiche radioaktive Markierung von Antikörpern zum Einsatz in Diagnostik und Therapie ist abhängig von mehreren grundlegenden Voraussetzungen (Eckelmann, 1980):

- 1.) Wahl eines geeigneten leicht erzeugbaren Radionuklides mit günstigen physikalischen Eigenschaften, wie ausreichender Halbwertszeit und optimalen Strahlungseigenschaften bei minimalsten Risiken der Handhabung.
- 2.) Entsprechende Methoden zur Koppelung bzw. zum Einbau des Radionuklides in das Antikörpermolekül, die möglichst wenig schädigend auf die Immunreaktivität des Antikörpers wirken, einfach in der Durchführung sind und sich auch für die Markierung größerer Proteilmengen eignen.
- 3.) Testmethoden zur Erfassung der Immunreaktivität von Antikörpern nach der Markierung, sowie Methoden zur Erfassung der Stabilitätseigenschaften radioaktiv markierter Antikörper.

Der Einsatz von Jodisotopen (J 123, J 125, J 128, J 131) geht bis in die vierziger Jahre zurück. Die ersten erfolgreichen Versuche zur Ermittlung der allgemeinen Markierungsbedingungen wurden von Pressman (1980) mit dem kurzlebigen J 128 und später auch mit J 131 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß nach Jodierung die immunologische Aktivität von Antikörpern erhalten geblieben war,

obwohl radioaktives Jod als Fremdatom in das Antikörpermolekül unter Veränderung seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften eingebaut worden war (Pressman, 1948). Die erste Technik, mit deren Hilfe man hohe Einbauraten bei der Proteinmarkierung mit radioaktivem Jod erzielen konnte, war die Jodmonochlorid-Methode (McFarlane, 1958). Durch Verwendung von Chloramin-T, einem oxidierenden Reagenz, wurde eine neue Markierungsmethode eingeführt, mit der auch bei Einsatz einer sehr kleinen Proteinmenge eine optimale Einlagerung von J^{131} in die Tyrosinreste des Proteins erfolgte (Greenwood et al., 1963). Durch ihre relativ einfache technische Durchführbarkeit fand diese Methode rasch weite Verbreitung bei der Markierung konventioneller und monoklonaler Antikörper. Als spezielle Nachteile dieses Markierungsverfahrens treten neben den grundsätzlichen Strukturveränderungen des Proteinmoleküls durch Einführung des fremden Jodatoms und den Schäden am Molekül, die durch die hohe Gammastrahlenbelastung hervorgerufen werden, mögliche Schädigungen auf, die auf die Verwendung eines Oxidationsmittels als Reaktionsvermittler zurückzuführen sind (Bale et al., 1980). Allgemein hat die Zahl der in das Molekül eingebauten Jodatome, mit einem optimalen Wert von einem Atom pro Molekül, entscheidenden Einfluß auf die Immunreaktivität markierter Antikörper (Bolton, 1979). Als Alternative zu den chemischen Oxidationsmethoden wurden die elektrolytische Jodierung (Pennisi et al., 1969), sowie die enzymatische Jodierung mit Laktoperoxidase (Marchalonis, 1969) als besonders schonende Methoden beschrieben. Eine Markierungstechnik, die bei einfachster technischer Durchführung zu sehr guten Jodeinbauraten mit minimalster Proteinschädigung führt, stellt die Jodogen-Methode dar (Fraker et al., 1978).

Jodogen als reaktive Substanz befindet sich dabei als feste Phase gebunden an der Wand des Reaktionsgefäßes und wirkt ohne in Lösung zu gehen auf die Jod-Antikörpermischung. Die bei allen beschriebenen Methoden (Abb. 1) auftretenden Verluste der Immunreaktivität, insbesondere bei Markierung von Maus-Immunglobulinen, sind möglicherweise Folge der Einlagerung von Jod in Tyrosinreste der antigenbindenden Region des Antikörpers und der daraus resultierenden radio-lytischen Schädigung durch das Isotop (Bolton, 1979). Daher wurde von Bolton et al. (1973) eine schonende Konjugationsmethode entwickelt, bei der ein spezieller Ligand radio-aktiv vormarkiert wird, und sich nach Vereinigung mit der Antikörperlösung an Proteinseitenketten, vornehmlich an Lysinreste koppelt (Abb. 1). Dabei ist das Protein weder den konzentrierten Jodisotopen, noch oxidierenden wie reduzierenden Substanzen ausgesetzt.

Da sich der Gebrauch von Jodisotopen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften und ihres Verhaltens im Organismus für bestimmte Anwendungen als ungünstig erwies (Sfakianakis, 1982), wurden in neuerer Zeit auch häufiger Versuche mit metallischen Radionukliden zur Antikörpermarkierung unternommen. Technetium-99m (Tc 99m) konnte weder durch Oxidationsmittel als Markierungsvermittler, noch bei Verwendung von Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA) als Chelatbildner unter Erhalt der ursprünglichen Immunreaktivität gekoppelt werden (Rhodes et al., 1982). Dagegen wurde von einigen Gruppen nach kovalenter Bindung von DTPA als bifunktionellem Chelator an das Antikörpermolekül und nach Komplexbindungsreaktion des Konjugates mit Indium-111 (In 111) eine gute Markierungsausbeute bei weitestgehend erhaltener Aktivität des Immunglobulins erzielt (Hnatowich et al., 1983). Neben den für die Diagnostik wichtigen Gammastrahlen-emittierenden Radionukliden, wurden vereinzelt

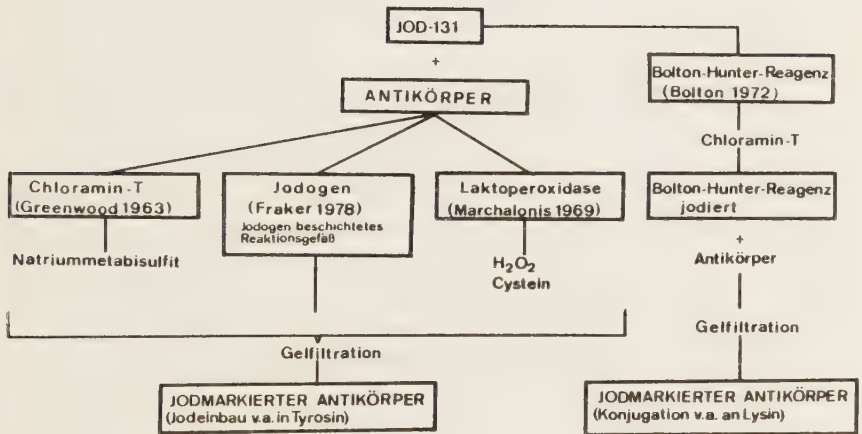


Abb. 1: Übersicht der gebräuchlichen Markierungsmethoden zur Markierung monoklonaler Antikörper mit Jod-131

Koppelungsversuche mit therapeutisch bedeutsamen Alpha- bzw. Betastrahlern unternommen. Beschrieben wurden Radioisotope wie Wismut-212 (Bi 212; Gansow et al., 1984), mit seiner extrem kurzen Halbwertszeit von einer Stunde, Kupfer-67 (Cu 67; Cole et al., 1983), Palladium-109 (Pd 109; Fawwaz et al., 1984), sowie Yttrium-90 (Y 90; Doherty et al., 1984).

III. Radioimmunszintigraphie

1. Einsatz polyklonaler Antikörper zur Immunszintigraphie

Paul Ehrlichs Konzept eines zielspezifischen Stoffes ("magic bullet") zur Diagnose und Therapie von Krankheiten bildete die Grundlage für den Einsatz von Antikörpern gegen Tumoren. Bereits einige Jahre zuvor waren von Héricourt und Rischet (1895) Antiseren zur Therapie von Tumoren eingesetzt worden.

Die grundlegenden Voraussetzungen für die Anwendung isoto- penmarkierter Antikörper zum diagnostischen Einsatz wurden erst Ende der vierziger Jahre geschaffen. Die Arbeitsgruppe um Pressman (1948, 1949a,b) konnte erstmals nachweisen, daß Kaninchenantikörper gegen Nierengewebe von Mäusen auch nach Markierung mit radioaktiven Isotopen ihre antigenbindenden Eigenschaften in vivo beibehielten und in den entsprechenden Gewebsstrukturen in hohem Maße akkumulierten. Der Nachweis der spezifischen Lokalisation des Anti-Nieren-Antikörpers im Vergleich zu einem Kontrollantikörper, sowie das Vorliegen von weitaus geringeren Aktivitäten in anderen Geweben waren der Anlaß für die Entwicklung von spezifischen polyklonalen Antiseren zur Lokalisierung verschiedener Organe (Leber: Korngold et al., 1953; Nebenniere: Hiramoto et al., 1958; Lunge: Tamanoi et al., 1961).

Im Zuge der Entwicklung von Antikörpern gegen Normalgewebearten gelang Pressman et al. (1953) erstmals auch der in vivo-Nachweis eines auf Mäuse transplantierten Osteosarkoms durch Applikation eines markierten Kaninchenantikörpers. Diese frühen Arbeiten zur Tumordarstellung mit radioaktiv markierten polyklonalen Antikörpern zeigten jedoch auch die Schwierigkeiten dieser Methode auf. Anwesenheit von zirkulierenden Antigenen im Blut, Vorliegen von Tumorantigenen auf normalen Gewebsstrukturen, unspezifische Anreicherung der eingesetzten Antikörper vornehmlich in Organen mit Metabolisierungs- und Ausscheidungsfunktionen und allgemein geringe Spezifität der eingesetzten Antiseren durch Vorhandensein kreuzreagierender Immunglobuline waren nur einige der auftretenden Probleme (Bale et al., 1980; Dillmann et al., 1984).

Mittels polyklonaler Antiseren wurden verschiedene Tumorantigene, sog. Tumormarker, auf ihre Eignung zur Tumorlokalisation untersucht. Markierte Antikörper gegen Karzinomembryonales Antigen (CEA; Primus et al., 1973; Hoffer et al., 1974; Mach et al., 1974), gegen alpha-Fetoprotein (Kim et al., 1980), und gegen Fibrin (Spar et al., 1959; Day et al., 1959) zeigten nur teilweise positive Resultate, was meist an ihrer geringen Spezifität lag. Durch hochabsorbierte Heteroantiseren konnte eine bessere Tumoranreicherung erzielt und damit auch die Voraussetzungen für eine szintigraphische Sichtbarmachung von Tumoren erfüllt werden. Im Tierversuch wurden verschiedene experimentelle Tumoren, wie auch humane Xenotransplantate auf Nacktmäusen mittels der Immunszintigraphie untersucht (Primus et al., 1977; Gaffar et al., 1981; Moshakis et al., 1981a).

Zur Verbesserung der szintigraphischen Darstellung wurde von Pressman et al. (1957) die Doppelisotopentechnik eingeführt, die es erlaubte Untergrundaktivitäten, hervorgerufen durch zirkulierende und unspezifisch gebundene Antikörper, getrennt zu erfassen. Bei Applikation eines zweiten nicht-spezifischen Antikörpers, gekoppelt mit einem Isotop anderer Strahlungsenergie, konnte durch 2-Kanalszintigraphie die in verschiedenen Körperregionen vorliegende durchblutungsbedingte Radioaktivität vom Bild des spezifischen Antikörpers abgezogen werden. Neben unspezifischen Immunglobulinen wurde auch Tc 99m-markiertes Albumin und TcO₄⁻99m als Blutpoolmarker eingesetzt (DeLand et al., 1980). Mit dieser Technik konnte auch die unspezifische Akkumulation von Immunglobulinen und Makromolekülen, insbesondere in Entzündungs- und Nekrosebezirken des Tumors und erstmals beschrieben von Duran-Reynolds (1939), im Verhältnis zur spezifischen Tumoreinlagerung erfasst werden. Als Nachteile ergaben sich dabei jedoch eine zusätzliche Strahlenbelastung des Patienten durch das zweite Isotop, sowie die Möglichkeit von Fehlerquellen in der szintigraphischen Darstellung (Perkins et al., 1984).

2. Einsatz monoklonaler Antikörper zur Immunszintigraphie

Mit der Einführung der Hybridomtechnologie 1975 boten sich auch hochspezifische monoklonale Antikörper gegen tumorssoziierte Antigene, gekoppelt mit verschiedenen Radioisotopen, als Diagnostika an. Die meisten Untersuchungen wurden dabei aufgrund eingeführter Markierungstechniken mit Jod-131 durchgeführt. Erfolgreich konnten eine Reihe auf die Nacktmaus xenotransplantierte Tumoren des Menschen szintigraphisch lokalisiert werden, wie zum Beispiel

Kolorektalkarzinome (Hedin et al., 1982; Epenetos et al., 1982; Herlyn et al., 1983; Keenan et al., 1984; Pimm et al., 1985a), Osteosarkome (Pimm et al., 1984), Melanome (Stuhlmiller et al., 1981), Neuroblastome (Jones et al., 1985), Teratome (Moshakis et al., 1981b), Lungenkarzinome (Zimmer et al., 1985), sowie eine Reihe von Tumoren der Maus (Levine et al., 1980; Scheinberg et al., 1982a, 1983; Midoux et al., 1984; Ballou et al., 1984).

Da auch bei Verwendung monoklonaler Antikörper das Problem hoher, die Bildqualität beeinflussender Untergrundaktivitäten auftrat, wurden neben der 2-Isotopentechnik zur Reduktion unspezifischer Aktivitäten auch regionale Applikationstechniken unter Umgehung der allgemeinen Zirkulation angewandt, um eine möglichst rasche Anreicherung im Tumor zu erzielen. Beispiele dafür sind die subkutane Verabreichung bei Lymphknotenmetastasen (Weinstein et al., 1983; Goodwin et al., 1985), bzw. die intraperitoneale Applikation bei Tumoren des Bauchraumes (Larson, 1985). Auch durch Injektion eines zweiten unmarkierten Antikörpers, gerichtet gegen den ersten spezifischen Antikörper, konnte die Aktivität des Blutpools nach kurzer Zeit um ein Vielfaches gesenkt werden (Wahl et al., 1985).

Eine Optimierung der Tumorlokalisation durch geringere unspezifische Gewebsbindung bei deutlich erhöhter Blutclearance wurde mit Antikörperfragmenten erzielt. Eine Reihe von Autoren berichteten über radioimmunszintigraphische Untersuchungen mit monovalenten Fab- und bivalenten $F(ab')_2$ -Fragmenten (Mach et al., 1980a; Houston et al., 1980; Wilbanks et al., 1981; Larson et al., 1983; Buchegger et al., 1983; Colcher et al., 1983; Wahl et al., 1983; Moldofsky et al., 1983; Carrasquillo et al., 1984; Beaumier et al., 1985; Ballou et al., 1985; Senekowitsch et al., 1985).

Da die Strahlungseigenschaften von Jod-131 infolge hoch-energetischer Gammastrahlung in Verbindung mit zytotoxischer Betastrahlung bei relativ langer Halbwertszeit für viele diagnostische Fragestellungen als ungünstig zu bezeichnen sind, wurden von einigen Arbeitsgruppen auch Radioisotope mit vorteilhafteren physikalischen Eigenschaften wie Indium-111 (Scheinberg et al., 1982b; Powe et al., 1984; Khaw et al., 1984; Fawwaz et al., 1985) eingesetzt. Indium-111-markierte Antikörper weisen auch aufgrund einer festeren Bindung des Isotops eine höhere Stabilität im Organismus im Vergleich zu jodmarkierten Antikörpern auf (Buchsbaum et al., 1985).

Über erste klinische Ergebnisse mit monoklonalen Antikörpern berichteten Mach et al. (1981), die mit CEA-spezifischen Antikörpern bei Patienten mit Kolorektal- und Pankreaskarzinomen in 50% der Fälle eine szintigraphische Lokalisation erzielen konnten. In den letzten Jahren wurden ausgedehnte klinische Studien mit monoklonalen Antikörpern unternommen, wobei mit Antikörpern gegen sogenannte Tumormarker, wie CEA, gegen die bereits polyklonale Antiseren mit guten Resultaten klinisch eingesetzt wurden (Goldenberg et al., 1978; Mach et al., 1980b), und mit Antikörpern gegen eine Vielzahl anderer Tumoren zum Teil gute Erfolge erzielt wurden (Melanome: Larson et al., 1983; Larson et al., 1985; Murray et al., 1985; Ovarialkarzinome: Symonds et al., 1985; Kolorektalkarzinome: Smedley et al., 1983; Chatal et al., 1984; Osteosarkome: Pimm et al., 1985b).

3. Radioimmundarstellung von Tumoren des Zentralnervensystems

Die strukturellen und funktionellen Besonderheiten des zentralen Nervensystems wirken sich auch erheblich auf das Lokalisierungsverhalten zur Diagnostik intracerebraler Tumoren eingesetzter Stoffe aus. Neben der Verwendung von konventionellen Radiotracern und radioaktiv markierten Substanzen, wie J 131-Serumalbumin und Neohydrin-Hg 203 (Feindel et al., 1963), deren Aufnahme von Tumor zu Tumor variierte, wurden in den sechziger Jahren einige Studien mit markierten Kaninchenantikörpern gegen humanes Fibrinogen unternommen, mit denen eine beträchtliche Tumorakkumulation erzielt werden konnte (DiChiro et al., 1963; McCardle et al., 1966; Marrack et al., 1967).

Mittels affinitätschromatographisch gereinigter und J 131-markierter Kaninchenantikörper gegen Gliome des Menschen konnten Day et al. (1965) nach intraarterieller Infusion die Bindungsfähigkeit dieser Antikörper an den Tumor in Gliombiopsien nachweisen. Autoradiographische Untersuchungen der Gewebsverteilung (Mahaley et al., 1965) wiesen auf die bevorzugte Anlagerung an Tumorzellen hin. In szintigraphischen Untersuchungen von Patienten mit Kolorektalkarzinomen konnten Gehirnmetastasen mit J 131-markierten monoklonalen Antikörpern erfolgreich dargestellt werden (Farrands et al., 1982). Phillips et al. (1983) etablierten durch Fusion von Lymphozyten aus operativ gewonnenem Gliommaterial mit Myelomzellen des Menschen Hybridome, die gliomspezifische Antikörper produzierten. Nach Markierung mit Jod-131 und intravenöser Applikation gelang der Nachweis eines Gliomrezidivs in vivo. Erfolgreiche Lokalisationsstudien an Nacktmäusen mit s.c und i.c. xenotransplantierten humanen Gliomen wurden von Bourdon et al. (1984) mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, wobei auch

bei intracerebralen Transplantaten hohe Tumoraktivitäten festgestellt werden konnten. Bullard et al. (1985) wiesen die Permeabilität normaler Rattenhirne für radioaktiv markierte monoklonale Antikörper bei gleichzeitiger Verabreichung hyperosmolarer Reagentien nach. Der erste Therapieversuch an einem Gliompatienten mit markierten monoklonalen Antikörpern wurde von Epenetos et al. (1985) unternommen, die im beschriebenen Fall eine völlige Remission des Tumors erreichen konnten.

C. PROBLEMSTELLUNG

Der Einsatz isotopengekoppelter Antikörper erwies sich in ausgedehnten experimentellen und klinischen Untersuchungen als vielversprechende Möglichkeit zur Diagnostik von Tumoren und Metastasen, die mit herkömmlichen Methoden nicht erfasst werden konnten (Neville et al., 1985). Hinsichtlich ihrer Diagnostizierbarkeit und vor allem ihrer Therapierbarkeit stellen maligne Gliome Problemfälle unter den Tumoren dar (Walker et al., 1979). Bei Applikation von radioaktiven, mit gammastrahlenden Nukliden markierten Antikörpern könnte eine entscheidende Verbesserung der Diagnostik erzielt werden. Alpha- bzw. betastrahlende Isotope gekoppelt mit monoklonalen Antikörpern könnten auch neue und wirksame therapeutische Möglichkeiten für maligne Gliome eröffnen.

In einer experimentellen Studie sollen die Eigenschaften eines radioaktiv markierten monoklonalen Maus-Antikörpers und seiner $F(ab')_2$ -Fragmente an einem transplantierten Rattengliom näher untersucht werden. Dabei sollen zunächst als Voraussetzung die Bedingungen zur Markierung der Immunglobuline mit Jod-131 unter Erhalt ihrer Stabilität und Immunreaktivität abgeklärt werden. Am Tumortransplantat der Nacktmaus soll danach das in vivo-Verhalten des intakten Antikörpers und seiner Fragmente im Vergleich zu unspezifischen Kontrollantikörpern untersucht werden. Neben der Ermittlung der selektiven Tumoranreicherung soll der in vivo-Stabilität und dem Metabolisierungs- und Ausscheidungsverhalten des Antikörpers besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Balb/c-Mäuse beiderlei Geschlechts, 6-8 Wochen alte männliche Balb/c-nu/nu-Mäuse, sowie neugeborene Fischer-Ratten (F344). Balb/c-nu/nu-Mäuse wurden unter keimreduzierten Bedingungen in "laminar-flow"-Regalen gehalten, während die übrigen Tiere aus konventionellen Haltungen stammten. Alle Tiere erhielten Altromin^(R) Presslinge (Nacktmäuse: Altromin^(R) 1410 Nacktmausdiät) als Standarddiät und Wasser (Nacktmäuse: angesäuert auf pH 2,5) ad libitum.

2. Zellmaterial

2.1. Zellkulturen

2.1.1. Permanente Gliomzelllinien

Für die regelmäßig durchgeführten Tests auf Antikörperproduktion, sowie zur Tumortransplantation wurde die permanente Gliomzelllinie 79FR-G-41 verwendet, die aus einem N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff induzierten Rattengliom etabliert worden war (Stavrou et al., 1980). Die Gliomzellen wurden in 50 ml und 250 ml Plastikflaschen (Nunc^(R), Nr.1-53732) bei 37°C im geschlossenen System kultiviert, als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Nr.074-2100), dem pro Liter 10% fetales Kälberserum (FKS, Flow Lab., Bonn), 100.000 I.E. Penicillin-G, 0.1 g Neomycin und 0.1 g Streptomycin zugesetzt wurden. Dichtgewachsene Kulturen wurden abtrypsiniert

(Saline-Trypsin-Versene Lösung: 100 ml Saline 10-fach, 25 ml 25%ige Trypsinlösung, 50 ml 1%ige Versene-Lösung, Aqua bidest. ad 1000 ml) und bei Bedarf im Verhältnis 1:20 bis 1:30 in neue Flaschen ausgesät. Die charakteristischen Wachstumseigenschaften der Zelllinie wurden durch regelmäßige intracerebrale in vivo-Passagen in neugeborenen Fischer-Ratten erhalten (79FR-G-41_{c1-c12}) und zusätzlich durch histologische Kontrolluntersuchungen von Transplantaten bestätigt.

2.1.2. Hybridomzellkulturen

Der zur Antikörperproduktion eingesetzte Hybridomklon 14AC1 wurde durch Fusion von Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653; Kearney et al., 1979) und Milzzellen einer mit der Gliomzelllinie 79FR-G-41 hyperimmunisierten Balb/c-Maus etabliert (Stavrou et al., 1983). Hybridomzellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im offenen System bei gesättigter Wasserdampf-atmosphäre kultiviert, als Nährmedium diente Earle's Minimum Essential Medium (MEM, Gibco; Zusätze pro Liter: 10% FKS, 100.000 I.E. Penicillin-G, 0.1 g Streptomycin, 0.1 g Neomycin, 13.6 mg Hypoxanthin, 3.87 mg Thymidin). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dauerkultur ohne "feeder-layer"-Zellen in 24-Lochplatten (Nunc^(R), Nr.1-63371), wobei einmal in der Woche auf neue Platten umgesetzt wurde. Um ein Überwuchern etablierter Kulturen mit nichtproduzierenden Kolonien zu vermeiden, wurden zur Stabilisierung der Zellen regelmäßige Klonierungen mit der Endpunktverdünnungsmethode (Goding, 1983) durchgeführt. Diejenigen Subklone, bei denen im mikro-ELISA bzw. in der indirekten Immunperoxidasefärbung die höchste Antikörperproduktion ermittelt wurde, dienten als Ursprungsklone zur Antikörperanreicherung in vitro und in vivo. Zur Erzielung maximaler Hybridomzellzahlen für die in vivo-Transplantation

an Pristane^(R) vorbehandelte Balb/c-Mäuse wurden 1 L-Glasindustrieflaschen als Kulturgefäße verwendet. Dabei wurde dem Medium Hepespuffer (Flow, 20 mM, Nr.16-884) statt Natriumbicarbonat zugesetzt und die Kultivierung erfolgte im geschlossenen System bei 37°C.

2.1.3. Mäuseperitonealzellen

In kritischen Phasen der Kultivierung, so bei der Klonierung und beim Auftauen tiefgefroren gelagerter Hybridomklone, wurden Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" verwendet. Diese Zellen wurden durch Bauchhöhlenspülung bei adulten Balb/c Mäusen gewonnen, denen 3-5 Tage vorher 0,7 ml Thioglycollate^(R)-Medium 10% (Difco, Nr.0256-02-9) intraperitoneal appliziert worden war. Als Spülflüssigkeit wurden 5 ml eines Standardmediums verwendet und die Bauchhöhle mehrmals mit einer weitlumigen Kanüle (0.9 x 35 mm) vorsichtig gespült. Nach Zentrifugation der wiedergewonnenen Flüssigkeit (5 min bei 1000 rpm) wurde die Zellkonzentration durch Resuspendieren des Zellpellets mit frischem Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer 24-Linbroplatte wurden 100 μ l, pro Vertiefung einer 96-Mikroplatte 10 μ l dieser Suspension ausgesät.

2.1.4. Hirnzellkulturen

Zum regelmäßigen Spezifitätsnachweis der produzierten Antikörper wurde ihre Reaktivität gegenüber Rattenhirnzellkulturen der 1. Passage festgestellt. Dazu wurde nach Dekapitation das gesamte Gehirn neugeborener Fischer-Ratten entnommen und mechanisch dissoziiert (Paul, 1980). Die Aussaat der Hirnzellsuspension erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen, die Bebrütung im geschlossenen System bei 37°C

mit M 199 Anzuchtmedium (Gibco Nr. 400-1200; Zusätze pro Liter: 20% FKS, 100.000 I.E. Penicillin-G, 0.1 g Streptomycin, 0.1 g Neomycin).

3. Nachweis der Bindungsspezifität

3.1. Mikro-ELISA

Als regelmäßige Routinemethode zum Nachweis gliomspezifischer Antikörper und zur Quantifizierung der Antikörperproduktion wurde der "enzyme-linked-immunosorbent-assay" (mikro-ELISA) nach Angaben von Posner und al. (1982) in modifizierter Form durchgeführt. Gliomzellen der Zielzelllinie 79FR-G-41 wurden auf festen 96-Loch Mikrotiterplatten ausgesät (Menge: ca. 10000 Zellen pro Vertiefung), über 1-2 Tage im offenen System bei 5% CO₂ bebrütet und als Monolayer mit kaltem Methanol/Aceton (1:1) 5 Minuten fixiert. Um unspezifische Proteinbindungen an die Platte auszuschließen erfolgte vor Verwendung der Platten eine einstündige Vorinkubation mit PBS-A/20% Schweineserum. Mit Serum vorinkubierte Platten wurden auch zur späteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren gelagert. Pro Vertiefung wurden 20 µl des zu testenden monoklonalen Antikörpers (Kulturüberstände, verdünnter Ascites) 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend wurde dreimal mit PBS-A/5% FKS gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubation von 50 µl eines 1:100 verdünnten Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörpers (Kaninchen-anti-Maus-IgG-HRPO, Dako) und sechs anschließenden Waschungen wurden 100 µl Substrat pro Vertiefung zugegeben (Zusammensetzung: 1 mg/ml Orthophenyldiamin (Sigma) gelöst in 0.1 M Citratpuffer pH 4.5, unmittelbar vor Gebrauch mit 4 µl/ml 3%igem H₂O₂ versetzt). Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte nach 20 Minuten

photometrisch mittels eines Titertek^(R)-Multiscanners MC (Flow. Lab., Bonn) bei einer Wellenlänge von 492 nm. Als Leerwertkontrolle und Maß der endogenen Peroxidaseaktivität wurden Zellen nur mit Substrat versetzt. Negative Kontrollen wurden mit X63-Ag8.653 Myelomkulturüberstand, positive Kontrollen mit Serum von Mäusen durchgeführt, die mit der Gliomzelllinie 79FR-G-41 immunisiert worden waren.

3.2. Indirekte Immunperoxidasefärbung

Als Referenzmethode zum mikro-ELISA, sowie zur Kontrolle der Reaktivität mit normalen Rattenhirnzellen wurde die indirekte Immunperoxidasefärbung durchgeführt (Pateraki et al., 1981). Die entsprechenden Zellen wurden 24 Stunden vor dem Versuch in Terasaki-Platten (Nunc^(R), Nr.1-63118) ausgesät (ca. 500 Zellen/Loch) und bei 37°C in 5% CO₂ bebrütet. Die nach dieser Bebrütungszeit vorliegenden subkonfluenten Zellmonolayerkulturen wurden vor Verwendung dreimal mit PBS-A gewaschen und anschließend mit kaltem Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) für 5 Minuten fixiert. 20 µl des ersten monoklonalen Testantikörpers wurden in die Löcher der luftgetrockneten Terasaki-Platte gegeben, und nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden sechs Waschschrte mit PBS-A durchgeführt, unterbrochen von einer 10-minütigen Inkubation mit PBS-A bei 37°C. Vom zweiten Antikörper, einem Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus-IgG (Dako), wurde eine Verdünnung von 1:100 in PBS-A/5% FKS hergestellt und 20 µl davon in jedes Loch der Platte einpipettiert. Die Waschschrte nach einstündiger Inkubation des zweiten Antikörpers bei 37°C wurden in gleicher Weise wie beim ersten Waschvorgang ausgeführt. Zur Sichtbarmachung der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion wurden 100 µl folgenden Substrats nach Nexø (1977) verwendet: 20 mg 3-amino-9-äthyl-Carbazol (Sigma) gelöst in

5 ml NN'-Dimethylformamid (Merck), in 95 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5.0, aufgenommen und nach Filtration der Lösung vor Gebrauch mit 50 μ l 30%igem H_2O_2 versetzt. Als Einwirkungszeit des Substrats wurden in der Regel 10 Minuten eingehalten, da nach dieser Zeit in den meisten Fällen bereits makroskopisch eine Reaktion sichtbar war. Die Farb-reaktion wurde durch vorsichtiges Abspülen des Substrates mit Aqua dest. gestoppt und die Löcher der Platte zur Aufbewahrung mit Kaiser's Glyceringelatine eingeschlossen. Die Auswertung wurde mikroskopisch durchgeführt, wobei 4 Abstufungen (negativ, schwach positiv, positiv, stark positiv) der Färbungsintensität unterschieden wurden. Die Kontrollansätze erfolgten wie beim mikro-ELISA.

4. Konservieren von Zellen und Hybridomprodukten

4.1. Einfrieren/Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen kamen zwei Methoden zur Anwendung:

4.1.1 Einfrieren von Gliomzellen/Hybridomen in Tubes (Nunc^(R) Cryotube Nr. 3-63401)

1×10^6 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (Grundmedium, 30% FKS, 10% Dimethylsulfoxid, Serva Heidelberg Nr. 20385) resuspendiert und in ein steriles Einfriertube überführt. Nach 4 Stunden Vorkühlung bei 4°C wurden die Zellen bei -80°C tiefgefroren (Ashwood-Smith, 1961).

4.1.2. Einfrieren von Hybridomazellen in Zellkulturplatten

Von subkonfluenten Kulturen in 24-Lochplatten wurde das Medium abgesaugt und anschließend jedes Loch zu einem

Drittel mit Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) gefüllt. Die Platten wurden mit Klebeband dicht versiegelt und in eine 37°C warme Styroporeinfrierbox überführt, die sofort bei -80°C gelagert wurde. Nach 24 Stunden konnte die gefrorene Platte entnommen werden und außerhalb der Box bei -80°C gelagert werden (De Leij et al., 1983).

4.1.3. Auftauen von Zellen

Einfriertubes wurden im 37°C warmen Wasserbad innerhalb von 3 Minuten aufgetaut, die Zellen in ein steriles Zentrifugenglas mit 2 ml Normalmedium überführt und sofort bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Pellets in Normalmedium konnten die Zellen auf 24-Loch-Linbroplatten mit Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" ausgesät werden. Zellkulturplatten wurden nach Abreiben mit 70%igem Isopropylalkohol 5 Minuten im temperierten (40°C) Wasserbad aufgetaut, das Einfriermedium abgesaugt und mit 37°C warmen Grundmedium wieder aufgefüllt.

4.2. Konservierung und Lagerung von Hybridomprodukten

Hybridomkulturüberstände wurden in der Regel steril gewonnen und entweder bei -20°C eingefroren oder bei 4°C mit 0.02% Natriumazidzusatz gelagert. Ascitesflüssigkeit wurde regelmäßig unter sterilen Bedingungen bei -20°C tiefgefroren (Ciocca et al., 1983). Zur Lagerung von gereinigten und konzentrierten Hybridomprodukten (präz. Ascites, präz. Überstand, monoklon. IgG aus Protein-A-Säule) wurde nach den entsprechenden Reinigungs- und Konzentrierungsschritten vor der Kühl Lagerung (4°C, -20°C) eine Sterilfiltration mit 22 µm Filtern (Millex-GV 22 µm, Millipore, SLGVO 25BS) durchgeführt. Zusätzlich wurden von bestimmten Antikörperchargen kleine Mengen gefriergetrocknet

(Gefriertrocknungsanlage: Gamma IA, Christ). Dabei wurde der in Phosphatpuffer, pH 7.0, gelöste Antikörper nach einer Vorkühlzeit von 2 Stunden einem 24-stündigen Gefrier-trocknungsvorgang unterworfen und anschließend noch im Va-kuum luftdicht im Gefäß verschlossen. Die weitere Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C.

5. Gewinnung und Reinigung monoklonaler Antikörper

5.1. Ascitesgewinnung

Zur Erzielung maximaler Antikörperkonzentrationen wurden 1×10^7 Hybridomzellen in 6-8 Wochen alte Balb/c-, sowie in Balb/c-nu/nu-Mäuse intraperitoneal transplantiert (McKearn, 1980). Die Mäuse waren 3-4 Wochen vorher mit 0.5 ml Pristane^(R) (2,5,10,14-Tetramethylpentadecan, Ega Chemie, Steinheim) intraperitoneal vorbehandelt worden. Zeigte sich 10-14 Tage nach Hybridomzelltransplantation eine birnenförmige Auftreibung des Abdomens der Tiere, so wurde die gebildete Ascitesflüssigkeit nach Tötung der Tie-re mittels einer weitlumigen Kanüle aus der Bauchhöhle ab-gezogen, 10 Minuten bei 1000 rpm zur Abtrennung zellulärer Bestandteile zentrifugiert und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur zur Fibringerinnung stehengelassen. Nach ei-ner abschließenden Zentrifugation (10 min, 2000 rpm) und Absaugen des flotierenden Pristanes^(R), konnte die gewon-nene zellfreie Ascitesflüssigkeit weiter gereinigt werden, bzw. bei -20°C gelagert werden.

5.2. Ammoniumsulfatpräzipitation

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung (1000 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 1000 ml Aqua dest., pH 7.0 eingestellt mit 30%iger NaOH) wurde den zu konzentrierenden Proben tropfenweise unter Rühren mit dem Magnetprüher zugegeben, bis eine Endkonzentration von 45% erreicht wurde (Goding, 1983). Die Suspension wurde anschließend mit dem Magnetprüher eine Stunde langsam weitergerührt. Danach wurde das Präzipitat 30 Minuten bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Beckmann Mod. L5.50), wieder gelöst in einer geringen Menge Ammoniumsulfatlösung und erneut zentrifugiert. Das Präzipitat der zweiten Zentrifugation wurde in einer kleinen Menge Aqua bidest. aufgenommen und 2 Tage gegen PBS-A, pH 7.3, unter mehrfachem Wechsel des PBS-A dialysiert.

5.3. Anreicherung von Immunglobulinen mittels

Potein-A-Sepharose-Affinitätschromatographie

Zur Markierung und Enzymspaltung vorgesehenes monoklonales IgG wurde mittels Protein-A-Sepharose-Affinitätschromatographie angereichert (Goding, 1978; Ey et al., 1979). 1.5 g Protein-A-Sepharose (CL-4B, Pharmacia, Nr.17-0780-01) wurden in 10 ml Phosphatpuffer, pH 8.5 (0.1 M Natriumhydrogenphosphat, 0.1 mM Thimerosal) aufgenommen und die Suspension nach 10-minütiger Quellzeit in eine 10 ml Einmalspritze gefüllt. Die Gelsäule von 5-6 cm³ wurde anschließend mit 20 ml des Phosphatpuffers nachgewaschen. Die zu trennende präzipitierte Ascitesprobe bzw. der präzipitierte serumfreie Kulturüberstand wurden mit Tris-HCl pH 8.8 auf pH 8.0 eingestellt und nach Mischen mit der gleichen Menge Phosphatpuffers auf die Säule aufgetragen (Auftragsmenge jeweils 5 ml). Durch Elution mit Phosphatpuffer wurden Fraktionen zu 5 ml gesammelt und ihre Absorption im Spektralphotometer

bei 280 nm gemessen. Der pH-Wert des Elutionspuffers wurde geändert, sobald die A_{280} auf den Nullwert zulief. Die Elution des IgG₁ wurde durch pH-Wechsel auf pH 6.0 mit 0.1 M Citratpuffer (0.1 M Natriumcitrat mit 1 M Zitronensäure auf pH 6.0 eingestellt) erreicht. Die weiteren Fraktionen wurden mit 0.2 M Glycin-HCl-Puffer (Merck), pH 2.8 bei einem Fraktionsvolumen von 2 ml eluiert, wobei sich in jedem Auffangglas zur Neutralisation 2 ml 0.2 M Natriumhydrogencarbonatlösung (Merck) befanden.

Mittels Bestimmung der Absorption bei 280 nm konnten diejenigen Fraktionen isoliert werden, in denen deutliche Mengen an Immunglobulin vorlagen. Die angereicherten IgG-Frak-tionen wurden zwei Tage lang gegen Ammoniumhydrogencarbonatlösung (10 mM) dialysiert und anschließend mittels Vakuumfiltration durch Kollodiumhülsen (Sartorius) eingeengt, wobei bestimmte Konzentrationen an IgG (1-5 mg/ml) eingestellt wurden.

Die Abschätzung des IgG-Gehalts wurde bei den verschiedenen Proben mittels Messung der Absorption bei 280 nm und der Näherungsformel (A_{280}) : $1.4 = (\text{mg/ml})$ durchgeführt (Lemke et al., 1980).

6. Charakterisierung monoklonaler Antikörper

6.1. Agargel-Immunodiffusion

In 7-Loch Immunodiffusionsplatten (Miles Lab., Nr 64-276-1) wurden zur Typisierung der Immunglobulinklasse 20 µl des zu untersuchenden monoklonalen Antikörpers (serumfreier Kulturüberstand, 10-fach konzentriert) in die zentrale Vertiefung der Platte pipettiert und gegen verschiedene Antisera in den peripheren Löchern ausgetestet

(Ouchterlony, 1962; verwendete Antiseren: Kaninchen-anti-Maus-IgG, Miles Nr.64301; Kaninchen-anti-Maus-IgG₁, Miles Nr.64360; Kaninchen-anti-Maus-IgG_{2b}, Miles Nr.64362; Kaninchen-anti-Maus-IgG_{2a}, Miles Nr.64361). Die Diffusionsplatten wurden zum Lauf in eine feuchte Kammer gestellt und zwei bis dreimal in Abständen von einigen Stunden nachgefüllt. Nach einer Laufzeit von zwei Tagen konnten die Platten ausgewertet werden.

6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die nähere Charakterisierung von intakten Antikörpern und Antikörperfragmenten nach Pepsinspaltung erfolgte mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung eines 7.5%igen Mittelporgeles (pH 8.9) bei nichtreduzierenden Laufbedingungen (Lämmli, 1970; Lamoyi et. al 1983).

Gelzusammensetzung:

1. Trenngel:

Lösung 1: 36.6 g Tris (hydroxylmethyl-)aminomethan (Merck)
0.23 g NNN'-N'-Tetramethylethylendiamin (Serva)
48.0 ml 1n HCl
ad 100 ml Aqua dest.

Lösung 2: 30.0 g Acrylamid (Serva)
0.8 g NN'-Methylenbisacrylamid (Roth)
ad 100 ml Aqua dest.

Lösung 3: 0.14 g Ammoniumpersulfat (Serva)
ad 100 ml Aqua dest.

Mischungsverhältnis:

3 ml von Lösung 1
6 ml von Lösung 2
12 ml von Lösung 3
3 ml H₂O
+ 0.024 g Natriumdodecylsulfat (Serva)

2. Sammelgel:

Lösung 4: 25.6 ml 1 M H_3PO_4 -Lösung

5.7 g Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Merck)
ad 100 ml Aqua dest.

Lösung 5: 10.0 g Acrylamid (Serva)

2.5 g NN'-Methylenbisacrylamid (Roth)
ad 100 ml Aqua dest.

Lösung 6: 4.0 mg Riboflavin (Merck)

ad 100 ml Aqua dest.

Lösung 7: 40.0 g Sacharose

ad 100 ml Aqua dest.

Mischungsverhältnis:

2 ml Lösung 4

4 ml Lösung 5

2 ml Lösung 6

8 ml Lösung 7

+ 0.016 g Natriumdodecylsulfat (Serva)

Vorbereitung der Gele:

Glasröhrchen wurden in der Gießvorrichtung befestigt und bis 7 cm Höhe mit der Trenngelmischung gefüllt. Überschichten mit 1 ml Wasser sorgte für das Entstehen einer planen Oberfläche während des Polymerisationsvorgangs. Nach 20 Minuten wurde das Wasser abgesaugt und auf die Trenngelfläche vorsichtig 1 cm der Sammelgelmischung geschichtet (Polymerisationszeit 20 Minuten).

Durchführung der Elektrophorese:

Die Gelröhrchen wurden in das gekühlte Elektrodengefäß eingedreht und Kammerpuffer (0.0025 M Tris(hydroxymethyl-)aminomethan, 0.192 M Glycin (Merck), 0.1% Natriumdodecylsulfat) eingefüllt. Vor der eigentlichen Auftrennung der Proben wurde ein Vorlauf mit reiner Probenlösung zur Ermittlung der Laufbedingungen durchgeführt (Zusammensetzung: 0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% Natriumdodecylsulfat,

10% Glycerol, 0.001% Bromphenolblau; Laufbedingungen: Vorlauf 10 min 1mA/Gel, 60 min 5mA/Gel).

Zum Hauptlauf wurden 50 µl der Probenlösung mit 50 µl der Antikörperlösung gemischt und vorsichtig auf die jeweiligen Gelröhrchen aufgetragen (Laufbedingungen: 20 min 1mA/Gel, 60 min 5mA/Gel).

Fixierung der Gele:

Trichloressigsäure (12.5 g auf 100 ml Aqua dest.)

Fixierungszeit: 20 Minuten

Färbung:

Comassie-Brilliant-Blue (0.2 g ad 100 ml Entfärbelösung)

Färbedauer bis zu 2 Stunden bei 40°C

Entfärbung:

Entfärbebad (100 ml Eisessig + 500 ml Methanol + 1 L Aqua dest.)

Dauer: bis zu 3 Tage bei mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung

7. Pepsinspaltung monoklonaler Antikörper

Zur Spaltung des monoklonalen IgG in $F(ab')_2$ - und Fc-Fragmente wurde Pepsin vom Schwein (Sigma, P-7012) bei einem Enzym : Substratverhältnis von 1:20 eingesetzt (Nisonoff et al., 1961; Lamoyi et al., 1983). Alle Schritte der Fragmentierung wurden im optimalen Temperaturbereich von 37°C durchgeführt. Jeweils 2 mg monoklonales IgG, gelöst in PBS-A, wurden mit 0.1 M Acetatpuffer (pH 4.2) auf pH 4.5 eingestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Pepsin (gelöst in 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.2) gegeben und die

Reaktionsmischung 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trispuffer (pH 8.8) gestoppt und die auf neutralen pH eingestellte Reaktionsmischung auf 4°C abgekühlt. Die Trennung der $F(ab')_2$ -Fragmente von den Fc-Fragmenten, sowie von ungespaltenem IgG erfolgte mittels zweimaliger Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose (Goding, 1978), wobei die bei pH 8.5 eluierten Fraktionen den $F(ab')_2$ -Fragmenten entsprachen, während die im sauren pH aufgefangenen Fraktionen ungespaltenes IgG und Fc-Fragmente enthielten. Die weitere Konzentrierung der $F(ab')_2$ -haltigen Proben wurde entsprechend des bei der Protein-A-Säule beschriebenen Vorgehens ausgeführt.

8. Radioaktive Markierung von Antikörpern mit Jod-131

8.1. Chloramin-T-Methode

Für die Markierung wurden jeweils 100 µl affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper (monoklonales IgG, $F(ab')_2$, polyklonales Maus-IgG; mit PBS-A (pH 7.2) eingestellt auf 1 mg/ml) eingesetzt. Zu 100 µl Antikörperlösung wurden 25 µl/lmCi NaJ-131 (185 MBq/125 µl, Amersham Int., UK) und 25 µl Chloramin-T (5 mg/ml PBS-A, Sigma C-9887) zugegeben (Greenwood et al., 1963). Nach einer Reaktionszeit von einer Minute wurde die Reaktion durch Reduktion des Chloramin-T mit 200 µl Natriummetabisulfit (279 mg/ml PBS-A.) gestoppt und das Reaktionsgemisch nach Zugabe von 20 µl Kaliumjodid (10 mg/ml PBS-A) auf eine, mit bovinem Serumalbumin vorbehandelte Sephadex G-25 medium Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die Elution der Fraktionen erfolgte mit 0.25 M Phosphatpuffer (pH 7.5), ihre Aktivität wurde durch Messung der einzelnen Proben im Isotopen-Kalibrator

(Berthold, Wildbad), bzw. im Bohrlochszintillationsdetektor (Gammaszint BF 5300, Berthold) bestimmt.

8.2. Jodogen-Methode

1.5 ml Eppendorfgefäße wurden mit Jodogen (Pierce Chem., Rotterdam; Menge: 5 µg/Gefäß) durch Lösung des Jodogens in Chloroform und anschließendem Abdampfen im Abzug beschichtet. Die Aufbewahrung der Reaktionsgefäße erfolgte bei -20°C bis zu einer Maximalzeit von 3 Monaten. Zur Markierung wurden 50-100 µl Proteinlösung (Gehalt: 100-400 µg Antikörper in 0.5 M Phosphatpuffer) einpipettiert und 25 µl /lmCi NaJ-131 (37 MBq) zugegeben (Fraker et al., 1978). Nach einer Reaktionszeit von 1-4 Minuten wurde das Reaktionsgemisch analog zur Chloramin-T-Methode über eine Sephadex-Säule gereinigt und die Aktivität der eluierten Fraktionen wie beschrieben gemessen.

9. In vitro-Untersuchungen an J 131-markierten Antikörpern

9.1 Dünnschichtchromatographie markierter Antikörper

Ein Tropfen der Antikörperfraktion wurde mit einer Kapillare auf eine DC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Platte wurde nach Eintrocknen des Tropfens in eine Laufkammer gestellt (Laufmittel: Aceton/N-Butanol/Ammoniak/Wasser; 65:20:10:5). Nach 1 bis 2 Stunden Laufzeit der Platte, bei einer Lauflänge der Front von 10 cm, wurde diese getrocknet und mit einem Dünnschichtscanner (Berthold) durch Zählrohrmessung der Betastrahlung des Jod-131 mit synchron aufzeichnender Schreibeinrichtung ausgewertet.

9.2. Zellautoradiographie

5×10^4 Gliomzellen wurden in speziellen, mit acht Kultivierungskammern versehenen Objektträgern (Lab-Teks^(R), Chamber Slides, Miles Nr.4838) ausgesät und bei offener 5%iger CO_2 -Atmosphäre bebrütet bis die Zellen als subkonfluente Monolayer vorlagen. Nach Waschung mit PBS-A wurden die Zellen mit Glutaraldehyd (0.5% in PBS-A) 20 Minuten fixiert, erneut dreimal gewaschen und mit PBS-A/30% Schweineserum eine Stunde vorinkubiert. Nach Abkippen des Serungemisches wurde jede der acht Kammern mit Jod-131-markierten Antikörpern (14 ACl-IgG, Maus-IgG) eine Stunde inkubiert (Ghose et al., 1975). Nach Absaugen der Antikörperlösung und Abnahme der Kultivierungskammern wurde der Objektträger sechsmal mit PBS-A gewaschen, um die ungebundene Radioaktivität zu entfernen. Die getrockneten Objektträger wurden danach in der Dunkelkammer in einer modifizierten Schlingentechnik mit Filmemulsion (K5-Nuklear Res. Emulsion, Ilford) überzogen. Die weitere Exposition der Objektträger erfolgte bei 4°C in einer lichtdichten Aufbewahrungsbox, wobei die Expositionszeit zwischen 14-20 Tagen variierte. Nach Entwicklung mit Phenisol-Entwickler (Ilford) wurden die Präparate nach Spülung und Fixierung keiner weiteren Gegenfärbung mehr unterzogen und sofort ausgewertet.

9.3. Absorptionsversuche mit radioaktiv markierten Antikörpern

Die Immunreaktivität radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper wurde zusätzlich durch einen quantitativen Absorptionstest mit steigenden Zellzahlen der Gliomzelllinie 79FR-G-41, sowie mit normalen Gliazellen bestimmt (Yeh et al., 1981).

Dazu wurden definierte Zellzahlen (5×10^5 , 1.5×10^6 , 2.5×10^6 , 3.5×10^6 , 5×10^6 , 1.0×10^7) in 0.5 ml PBS-A in Reaktionsgefäßen suspendiert und 25 µl der markierten Antikörperfraktion zugegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Gefäße zentrifugiert und vom Überstand 25 µl entnommen. Die Aktivitätsbestimmung der Proben erfolgte im Bohrlochszintillationsdetektor (Berthold, Wildbad).

10. Szintigraphische Darstellung von Gliomtransplantaten

10.1. Tumortransplantationen

6-8 Wochen alten Balb/c-Mäusen wurden 3×10^6 Gliomzellen der Zelllinie 79FR-G-41_{C9} (in 0.2 ml PBS-A) entweder intramuskulär in den rechten Oberschenkel oder subkutan im Bereich der rechten Flanke injiziert. Nach 14-20 Tagen, bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 1 cm^3 , wurden die Tiere für die Versuche verwendet. Einigen Tieren wurden auch geringere Zellmengen ($0.5 - 1 \times 10^6$) injiziert, um das Verhalten des Antikörpers bei kleineren Tumoren zu untersuchen.

Zur intracerebralen Transplantation von Tumorzellen (Shapiro et al., 1979; Schold et al., 1983;) wurden Balb/c-nu/nu-Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 0.2 ml einer Ketanest^(R)/Rompun^(R)-Mischung (0.1 ml Ketanest^(R) mit 100 mg/ml gemischt mit 0.1 ml Rompun^(R) mit 5 mg/ml) narkotisiert. Mittels eines Hamilton^(R)-Mikroinjektors (Hamilton^(R), Bonaduce) mit Dosiereinrichtung wurden 10 µl einer Zellsuspension (ca. 50000 Zellen) bei einer maximalen Einstichtiefe von 3 mm im Mittelpunkt einer vom rechten Auge zum rechten Ohr ziehenden Linie in die rechte Großhirnhemisphäre appliziert. Es wurde besonders

darauf geachtet, daß beim Zurückziehen der Kanüle (0.45 x 13 mm) kein Zurückfließen von Zellsuspension unter die Kopfhaut erfolgte, da dies zur Bildung subkutaner Tumoren führte. Die Tiere wurden 20-30 Tage nach Injektion für die Versuche verwendet, da nach dieser Zeit bereits die ersten zentralnervösen Ausfallserscheinungen auftraten.

10.2. Applikation jodmarkierter Antikörper

Bei entsprechender Größe der Transplantate erhielten die Versuchstiere Antikörper i.v. über die Schwanzvene verabreicht. Einem kleinen Teil der Tiere wurde der Antikörper jedoch auch intraperitoneal injiziert, um Unterschiede zwischen beiden Applikationsmethoden zu untersuchen. Je nach Zweck der Versuchsreihe wurden dabei Antikörpermengen von 10-30 µg mit einer Aktivität von 50-200 µCi (1.86-7.46 MBq) eingesetzt. Bei einigen Versuchen, insbesondere bei Tieren mit intracerebralen Transplantaten, wurde 3 Tage vor Injektion radioaktiver Immunglobuline eine Schilddrüsenblockade mit Natriumperchlorat (Irenat^(R), Troponwerke; Dosis: 50 Tropfen auf 250 ml Trinkwasser) durchgeführt. Zur Untersuchung, ob die Vorinjektion von nichtradioaktiven monoklonalen Antikörpern Einfluß auf die szintigraphische Darstellung des Tumors hat, wurde 6-8 Stunden vor Injektion des "heißen" Immunglobulins pro Maus 1 ml präzipitierter Ascites 14 AC1 (Antikörpergehalt: 2 mg/ml) i.p. injiziert.

10.3. Externe Szintigraphie

Die szintigraphische Darstellung der Verteilung der markierten Antikörper und Fragmente wurde mit einer Gamma-kamera (Phillips) mit 2 mm pinhole-Kollimator bei computer-unterstützter Datenspeicherung und Auswertung (Phillips MPS mit DEC PDP 11/34) durchgeführt.

Folgende feste Aufnahmeparameter wurden bei allen Aufnahmen eingehalten:

1. Energieeinstellung der Kamera auf dem 365 keV-"Peak" für Jod-131 bei einem Fenster von 20%.
2. Narkose der Tiere (0.2ml der Ketanest^(R)/Rompun^(R) - Mischung) und Aufnahme der Szintigramme in ventro-dorsaler Projektion mit einem Abstand vom Kollimator, bei dem das Gesamttier das Gesichtsfeld des Szintillationskristalls gerade ausfüllte.
3. Zählung der auflaufenden Impulse mit automatischer Beendigung der Aufnahme nach 40000 Impulsen.
4. Digitale Computerspeicherung der Daten in einer 64 x 64 Matrix.

Aufnahmen wurden in der Regel 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Injektion durchgeführt. Für besondere Fragestellungen wurden auch unmittelbar, 3, 6 und 12 Stunden p.i., sowie zu späteren Zeitabständen bis zu 168 Stunden p.i. Szintigramme erstellt. Mit Hilfe der "region-of-interest"-Technik (ROI) konnten auf den unter identischen geometrischen Bedingungen aufgezeichneten Szintigrammen bestimmte Regionen (Kopfbereich, tumortragende Gliedmaße, gegenüberliegende Gliedmaße) ausgewählt werden und die relativen Zählraten der Radioaktivität ermittelt werden und miteinander verglichen werden.

11. Biokinetische Studien zur Verteilung und Elimination markierter intakter Antikörper und Fragmente

11.1. Ganzkörpermessungen zur Ermittlung der Retention markierter Antikörper

Zur Ermittlung der Retention von markierten intakten Antikörpern und $F(ab')_2$ -Fragmenten wurden in regelmäßigen Zeitabständen (unmittelbar nach der Injektion, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168 Stunden p.i.) Messungen der Tiere in einem selbstgebauten Kleintierganzkörperzähler (Berg, 1982) durchgeführt, der aus zwei 5" x 4" NaJ (Tl) Detektoren bestand, die mit 5 cm Blei und 5 cm Kupfer abgeschirmt waren. Zur Aufnahme von Energiespektren waren diese Detektoren an einen Vielkanalanalysator angeschlossen und konnten zur Anpassung an die jeweils zu ermittelnde Zählrate in unterschiedlichen Abstand vom Meßobjekt gebracht werden. Alle Retentionswerte wurden durch Gammaskopie ermittelt und auf Nulleffekt und physikalischen Zerfall korrigiert, wobei die erste Retentionsmessung unmittelbar nach Applikation des aktiven Antikörpers als 100%-Wert und Bezugswert für die folgenden Messungen diente. Die Retention wurde als Prozentsatz der applizierten Aktivität berechnet.

11.2. Verteilungsstudien

Zur Untersuchung der Biokinetik der verabreichten Antikörper wurden 24, 48, 72, 96 und 168 Stunden nach der Injektion Gruppen von Tieren ($n = 3$) in Äthernarkose durch Entbluten getötet. Nach Präparation der Organe und deren Wägung erfolgte die Messung der Impulsrate in Blutproben, Tumor, Leber, Niere, Milz, Lunge, Magen, Muskel, Gehirn und Schilddrüse in einem Bohrlochszintillationsdetektor (Gamma-szint BF 5300, Berthold). Der in den Proben enthaltene

Anteil der Aktivität wurde durch Bestimmung der Impulsrate einer Standardprobe auf die injizierte Aktivität bezogen. Aus den ermittelten Meßwerten und den Gewichten der Organe wurde die Aktivitätskonzentration in den Geweben als Prozentsatz der verabreichten Dosis pro Gesamtorgan, bzw. als Prozentsatz der verabreichten Dosis pro Gramm Gewebe errechnet. Das Gesamtblutvolumen wurde als 7.5%iger Anteil des Körpergewichts bestimmt. Zusätzlich wurde der Quotient aus Prozentsatz der verabreichten Aktivität pro g Gewebe / Prozentsatz der verabreichten Aktivität pro g Blut errechnet.

II. ERGEBNISSE

1. Hybridomzellkulturen (Klon 14 AC1)

Hybridomzellen des verwendeten Klones 14 AC1 konnten über lange Zeit ohne Verwendung von Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" kultiviert werden. Voraussetzung für eine gleichbleibend stabile Antikörperproduktion war jedoch einerseits die laufende Kontrolle der Kulturüberstände auf Antikörpergehalt mit der micro-ELISA-Methode (durchschnittliche Absorption im mikro-ELISA: 0.200 - 1.500), andererseits die regelmäßig durchgeführte Reklonierung produzierender Hybridomkolonien, um ein Überwuchern mit nicht-produzierenden Varianten zu vermeiden. Wurde die Klonierung unterlassen, so konnte nach 4 - 5 Wochen im micro-ELISA und in der indirekten Immunperoxidasefärbung ein deutlich geringerer Gehalt an spezifischem Antikörper festgestellt werden. Im mikro-ELISA sank die gemessene Absorption unter 0.100. Diese Kulturen zeigten aber völlig unveränderte Wachstumseigenschaften.

Antikörperfraktionen, die für in vivo-Versuche verwendet wurden, wiesen in der indirekten Immunperoxidasefärbung eindeutig eine selektive Bindungsfähigkeit mit Tumorzellen der zur Tumortransplantation eingesetzten Gliomzelllinie 79FR-G-41 auf. In der Reaktion mit normalen neonatalen Rattenhirnzellen ergaben sich stets negative Resultate.

2. Produktion monoklonaler Antikörper in vitro / in vivo

Die Kultivierung von großen Hybridomzellmengen für die in vivo-Anreicherung monoklonaler Antikörper in Pristane^(R) vorbehandelten Balb/c-Mäusen erfolgte in mehrfach verwendbaren 1 L-Glasindustrieflaschen.

Nach Einsaat von 1×10^4 bis 1×10^5 Zellen pro Flasche konnten bei Verwendung eines hepesgepufferten Normalmediums bereits nach 4-5 Tagen dichtgewachsene Hybridomkulturen geerntet werden.

Nach intraperitonealer Transplantation von 1×10^7 Hybridomzellen in Pristane^(R) vorinjizierte Mäuse konnte bei 80% der Tiere eine Ascitesbildung festgestellt werden. Die Ascitesentnahme wurde in der Regel nach zwei Wochen durchgeführt, wobei durchschnittlich 5 ml (1-8 ml) Ascitesflüssigkeit gewonnen werden konnten. Durch Titerbestimmung mittels micro-ELISA wurden Grenztiter von 1:100000 ermittelt. Bei Transplantationsversuchen an Balb/c-nu/nu-Mäusen zeigte sich bereits nach 5-7 Tagen eine deutliche Ascitesbildung. Nach diesem Zeitraum konnten 4-8 ml blutdurchsetzte Bauchhöhlenflüssigkeit abgenommen werden. Im Gegensatz zu normalen Mäusen fanden sich bei den Tieren jedoch kaum solide Bauchhöhlentumoren. Versuche zur Verminderung der zur Transplantation nötigen Zellzahlen ergaben, daß bereits nach Applikation von 1×10^6 Zellen bei Nacktmäusen Ascites ausgebildet wurde.

3. Konservieren von Zellen und Hybridomprodukten

Durch Einfrieren von subkonfluenten Hybridomkulturen in 24-Lochplatten konnten, außer der arbeitstechnischen Erleichterung, bessere Ergebnisse in der Anwachsrate wieder-aufgetauter Kulturen im Vergleich zur herkömmlichen Einfrierweise erzielt werden. Tiefgefrorene Platten konnten so bis zu 5 Monate nach der Einlagerung erfolgreich aufgetaut werden.

Zur Dauerkonservierung von Hybridomprodukten wurden Versuche zur Gefriertrocknung antikörperhaltiger Proben durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei den lyophilisierten Proben mit geringem Antikörpergehalt (z.B. Kulturüberstände) eine deutlich reduzierte Immunreaktivität der wiedergelösten Proben vorlag. Bei konzentrierten Ascitesfraktionen traten bei Vergleich des Antikörpertiters vor und nach der Lyophilisation nur geringe Aktivitätsverluste auf. Mit fortdauernder Lagerzeit (max. 1 Jahr) der trockenen Proben bei 4°C konnten durch wiederholte Tests im micro-ELISA keine bemerkenswerten Einbußen in der Immunreaktivität festgestellt werden.

4. Reinigung und Pepsinspaltung der Immunglobuline

Mittels Protein-A-Affinitätschromatographie konnten die im Präzipitat der Ammoniumsulfatfällung enthaltenen monoklonalen Immunglobuline angereichert werden.

F(ab')₂-Fragmente konnten aus intakten Immunglobulinen bei einem in verschiedenen Vorversuchen als günstig ermittelten Enzym : Substratverhältnis von 1 : 20 gewonnen werden. Die Ausbeute der Fragmentierung variierte zwischen 30% und 80 % als bestem Ergebnis. Als entscheidend erwies sich neben der Enzymkonzentration die genaue Einhaltung des pH-Werts (pH 4.5) und der Temperaturbedingungen (37°C).

Eine ausreichende Trennung der F(ab')₂-Fragmente von ungespaltenen Immunglobulinen und Fc-Fragmenten wurde mit der Protein-A-Sephrose-Säule durch Elution bei pH 8.5 erreicht (Abb. 2). Dabei bewährte sich ein zweiter Säulendurchlauf, da nach einmaligem Säulendurchlauf noch Spuren von intakten Immunglobulinen in der Fragmentfraktion mittels doppelter Immunodiffusion bzw. Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachzuweisen waren.

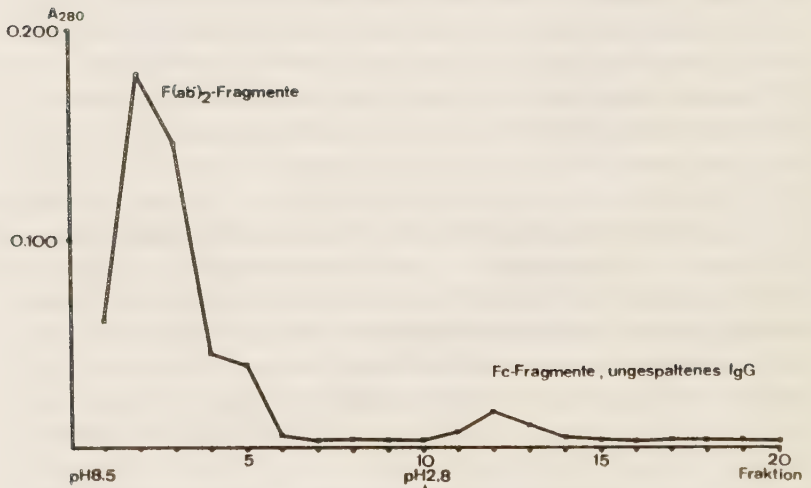


Abb. 2: Isolierung von F(ab)₂ Fragmenten mittels Protein-A-Sepharose-Säule nach Pepsinspaltung des monoklonalen Antikörpers 14AC1 (Elution mit Phosphatpuffer pH 8,5 und Glycin/HCl - Puffer pH 2,8)

5. Charakterisierung monoklonaler Antikörper und Antikörperfragmente

In der Agargel-Immunodiffusion zeigte sich bei Verwendung von konzentriertem serumfreiem Kulturüberstand des Klonen 14 AC1 eine deutliche Präzipitationslinie bei Diffusion gegen IgG_{2a}-Antiserum (Abb.3a). Bei den übrigen subklassenspezifischen Antiseren konnten keine Banden beobachtet werden. Bei Untersuchung von 1 : 10 verdünntem Ascites der Ammoniumsulfatfällung konnten schwache Banden bei IgG₁ und IgG_{2b} nachgewiesen werden, was auf das Vorliegen unspezifischer mitausgefällter Ascites-Immunglobuline schließen läßt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erwies sich als geeignete Methode zur Charakterisierung intakter Antikörper und F(ab')₂-Fragmente. Nach Durchführung des Laufes unter nichtreduzierenden Bedingungen trat beim intakten IgG im Vergleich zu den Fragmenten eine Bande im höheren Molekulargewichtsbereich auf (Abb.3b). Neben der charakteristischen F(ab')₂-Bande fanden sich bei einigen Proben einzelne sehr schwach ausgeprägte Banden, die vermutlich auf spaltungsbedingte Verunreinigungen mit Fc-Fragmenten zurückzuführen waren.



Abb. 3a: Agargel-Immunodiffusion

Loch (a) : 14 AC1-Überstand (serumfrei, 10-fach konz.)

Loch (b) : Anti-Maus-IgG₁

Loch (c) : Anti-Maus-IgG_{2a}

Loch (d) : Anti-Maus-IgG_{2b}

Die übrigen Löcher wurden mit PBS-A gefüllt.

Deutlich zu sehen ist die Präzipitationslinie zwischen Loch (a) und Loch (c).

Abb. 3b: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(a) Protein-A-Fluat bei pH 8.5 nach Pepsinspaltung
(F(ab')₂-Fraktion)

(b) 14 AC1-IgG (Protein-A-angereichert aus Ascites-
flüssigkeit)

F(ab')₂-Fragmente (a) und intaktes IgG (b) zeigen unter nichtreduzierenden Bedingungen charakteristische Banden.

6. Radioaktive Markierung der Antikörper mit Jod-131

Von insgesamt 27 Markierungsversuchen mit Jod-131 wurden 10 Markierungen mit Jodogen und 17 Markierungen mit Chloramin-T als reaktionsvermittelnder Substanz durchgeführt. Markiert wurden monoklonale Antikörper und $F(ab')_2$ -Fragmente, sowie polyklonale Maus-Immunglobuline als Kontrollantikörper. Mit beiden Methoden konnten bei intakten mono- und polyklonalen Antikörpern gute Markierungsausbeuten erzielt werden (Tab. 1). Eine Verlängerung der Reaktionszeit des Chloramin-T führte jedoch zu verminderter Jodeinlagerung in das Protein.

Für die $F(ab')_2$ -Fragmente wurden nur mit der Jodogen-Methode gute Ergebnisse erhalten, während bei Verwendung von Chloramin-T als Oxidationsmittel die Ausbeute deutlich unter 40% lag. Im Vergleich zur Chloramin-T-Methode war die Jodogen-Methode auch einfacher durchführbar. Mit Jodogen als Festsubstanz an der Wand des Markierungsgefäßes konnten arbeitstechnisch günstigere längere Reaktionszeiten eingehalten werden, da das unlösliche Oxidationsmittel mit der Jod-Antikörpermischung kaum in Berührung kam. Der Reaktionsstop konnte durch einfaches Entfernen der Lösung aus dem Eppendorfgefäß ohne Zusatz von Reduktionsmitteln erreicht werden.

Bei der Trennung des Reaktionsansatzes auf der Sephadex G-25 Säule konnte bei den erfolgreichen Markierungen ein deutlicher Protein-"Peak" isoliert werden (Abb. 4), während der Anteil des freien Jod-131 relativ gering war. Trotz Vorabsättigung der Säule mit bovinem Serumalbumin wurde eine nicht unerhebliche unspezifische Proteinretention beobachtet. Geringe Mengen markierten Proteins konnten mit zeitlicher Verzögerung nach dem Protein-"Peak" aus der Säule eluiert werden.

Tab.1: Vergleich zwischen Chloramin-T-Methode und Jodogenmethode zur J 131-Markierung von intaktem IgG und F(ab')₂-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers 14 AC1, sowie von polyklonalem Maus-IgG. (Markierungsausbeute als Prozentsatz der eingesetzten Aktivität gemessen nach Gelfiltration in der Proteinfraction.)

CHLORAMIN-T-METHODE

Vers.Nr.	Antikörper	Markierungsausbeute	Bemerkungen
1	14AC1-IgG	74%	100µg Chloram.-T
	polykl. Maus-IgG	68%	Reaktionszeit 60s
2	14AC1-IgG	46%	200µg Chloram.-T
	14AC1-F(ab') ₂	18%	Reaktionszeit 120s
3	14AC1-IgG	61%	100µg Chloram.-T
	14AC1-F(ab') ₂	35%	Reaktionszeit 90s

JODOGEN-METHODE

4	14AC1-IgG	60%	Reaktionszeit 60s
	polykl. Maus-IgG	64%	
5	14AC1-IgG	78%	Reaktionszeit 60s
	14AC1-F(ab') ₂	67%	
6	14AC1-IgG	80%	Reaktionszeit 4min
	14AC1-F(ab') ₂	65%	

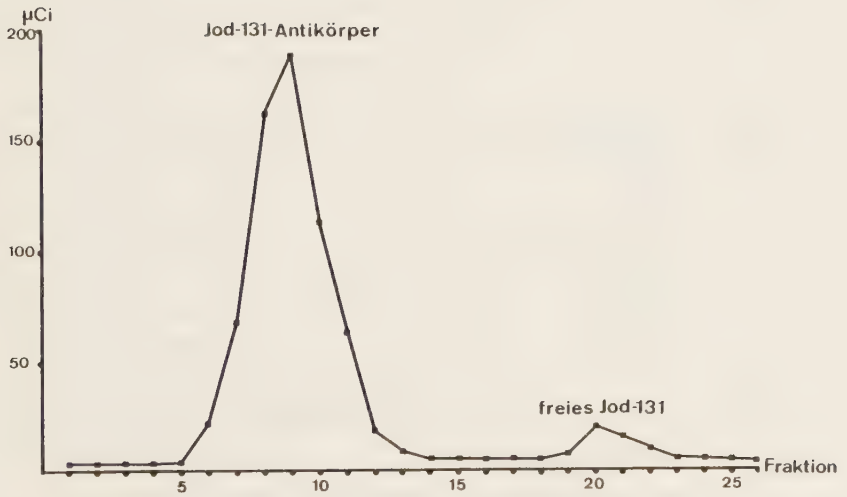


Abb. 4: Gelfiltration eines monoklonalen Antikörpers(14 AC1) nach Jod-131-Markierung mittels Chloramin-T Methode (Gel: Sephadex G-25 medium)

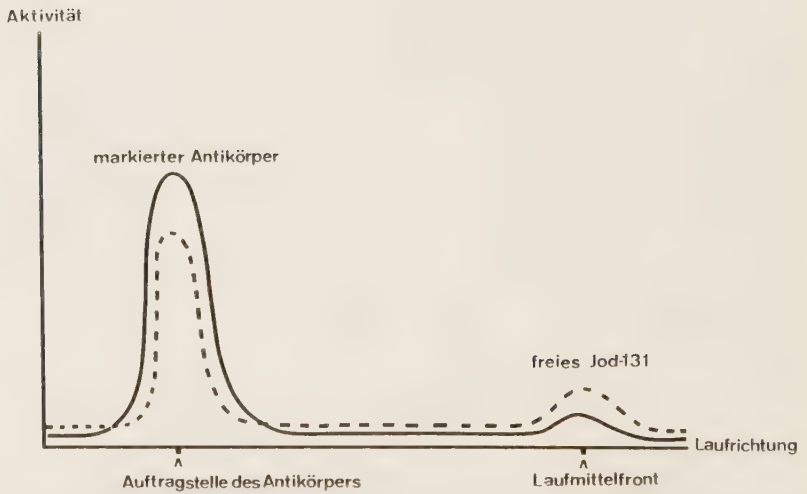


Abb. 5: Dünnschichtchromatographie eines mit Jod-131 markierten monoklonalen Antikörpers (14 AC1)
Messung der Radioaktivität durch Dc-Scanner)
(— sofort nach Markierung, ---- 7 Tage nach Markierung)

7. In vitro-Untersuchungen mit Jod-131-markierten Antikörpern

7.1. Dünnschichtchromatographie markierter Antikörperfraktionen

Die aus der Sephadex-Säule aufgefangenen radioaktiven Proteinfraktionen wurden vor Verwendung für in vivo-Versuche regelmäßig dünnschichtchromatographisch untersucht. Es zeigte sich, daß nach Markierung und Gelfiltration nur geringe Spuren an freiem Jod-131 vorhanden waren (Abb. 5). Zur Ermittlung der Stabilität markierter Immunglobuline wurden Antikörper bei 4°C bis zu 7 Tage nach der Markierung gelagert. Mit zunehmender Zeitdauer konnte ein Ansteigen des freien Jods in den Proben beobachtet werden (Abb. 5). In diesem Zusammenhang sei festgestellt, daß nach in vivo-Applikation dieser Antikörper eine deutlich verminderte in vivo-Stabilität bei wesentlich beschleunigter Ausscheidung der verabreichten Aktivitäten ermittelt werden konnte, ein Befund der auf einen hohen Anteil an freiem Isotop hinweist.

7.2. Zellautoradiographie und Absorptionsversuche

Die Bindungsfähigkeit des markierten tumorspezifischen Antikörpers mit der Gliomzelllinie 79FR-G-41 konnte durch Zellautoradiographie bestätigt werden.

Fixierte Gliomzellen, die mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern eine Stunde inkubiert worden waren, zeigten eine deutliche Akkumulation von Silbergranula auf der gesamten Zelloberfläche. Zellen, die mit unspezifischen Kontroll-Immunglobulinen überschichtet worden waren, wiesen dagegen kaum Schwärzungsareale auf.

Bei Absorptionsversuchen mit steigenden Gliomzellzahlen der Zelllinie 79FR-G-41 nahm die im Überstand der zellfrei zentrifugierten Versuchsansätze verbleibende Radioaktivität im Bereich höherer Zellzahlen ab (Abb. 6). Zusätzlich trat bei niedriger Zellzahl eine ansteigende Prozone auf. Bei normalen Gliazellen, die in derselben Weise mit markierten monoklonalen 14 ACl-Antikörpern inkubiert worden waren, konnte kein Abfall der Absorptionskurve beobachtet werden (Abb. 6).

8. Szintigraphische Darstellung von Gliomtransplantaten

8.1. Intakte Antikörper

Mittels externer Szintigraphie konnten in 10 Versuchsserien Gliomtransplantate sowohl mit intakten monoklonalen Antikörpern, als auch mit $F(ab')_2$ -Fragmenten dargestellt werden.

Aufnahmen, die unmittelbar nach Injektion gemacht wurden, zeigten ein für alle Antikörper identisches Bild (Abb. 7) einer hohen Aktivitätsanreicherung besonders in Regionen hoher relativer Blutmengen im Bereich des Brust- und Bauchraumes.

Nach 24 Stunden stellte sich beim intakten monoklonalen Antikörper der Tumor bereits schwach dar. Es konnten im Szintigramm zwei Hauptregionen hoher Aktivität unterschieden werden, von denen eine im Tumorbereich, die andere im Bereich der blutreichen Organe, wie Leber, Milz, Niere, Magen und Lunge lag (Abb. 7).

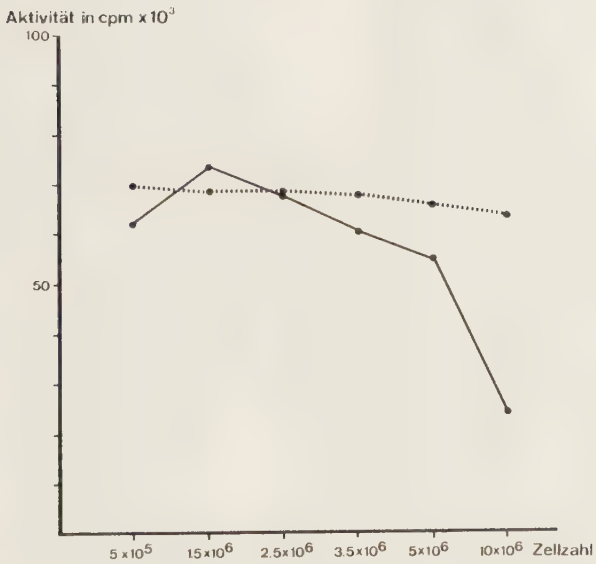


Abb. 6: Absorption von ^{125}I -markierten Antikörpern (14 AC1-IgG) mit steigenden Zellzahlen
(— Gliomzellen 79FR-G-41, normale Gliazellen)

Im Gegensatz dazu war nach der Injektion von polyklonalem Kontroll-IgG keine spezifische Lokalisation des Tumors möglich. Auch zeichnete sich die Blutpoolaktivität in den Organen wesentlich geringer ab (Abb. 8). Die festgestellte hohe radioaktive Kontamination von Einstreu und Käfigen bei diesen Tieren läßt auf eine starke Ausscheidung des unspezifischen Antikörpers schließen.

Nach 48 Stunden veränderte sich im Bild des intakten monoklonalen Antikörpers relativ wenig (Abb. 7). Der Tumor war gut sichtbar, in den Organen lagen aber immer noch starke Untergrundaktivitäten vor.

Erst nach 72 - 96 Stunden konnte ein deutlicher Abfall der allgemeinen Blutpoolaktivität beobachtet werden, der nach 96 Stunden zur guten Differenzierung des Tumors von anderen Gewebsstrukturen bzw. Organen beitrug (Abb. 7). In Versuchen, die auf längere Zeiträume ausgedehnt wurden, konnte der Tumor auch 7 Tage p.i. noch eindeutig lokalisiert werden. Bei den Kontrolltieren wurde zu keinem Zeitpunkt eine Anreicherung des radioaktiven polyklonalen Maus-Antikörpers im Tumor festgestellt (Abb. 8).

Auf eine Blockade der Schilddrüse wurde meist verzichtet, da ihre szintigraphische Darstellung als Maß für die in vivo stattfindende Dejodierung des Antikörpers gewertet werden konnte. In einigen Versuchen konnte die Schilddrüse, die sich durch Aufnahme freien radioaktiven Jods bereits 1-2 Tagen p.i. stark abzeichnete, jedoch durch Zusatz von Natriumperchlorat zum Trinkwasser erfolgreich blockiert werden. Wurde die Blockade im Laufe des Versuches durch Absetzen des Perchlorat-haltigen Trinkwassers unterbrochen, so konnte 24 Stunden später bereits eine Einlagerung freien Jods szintigraphisch nachgewiesen werden.

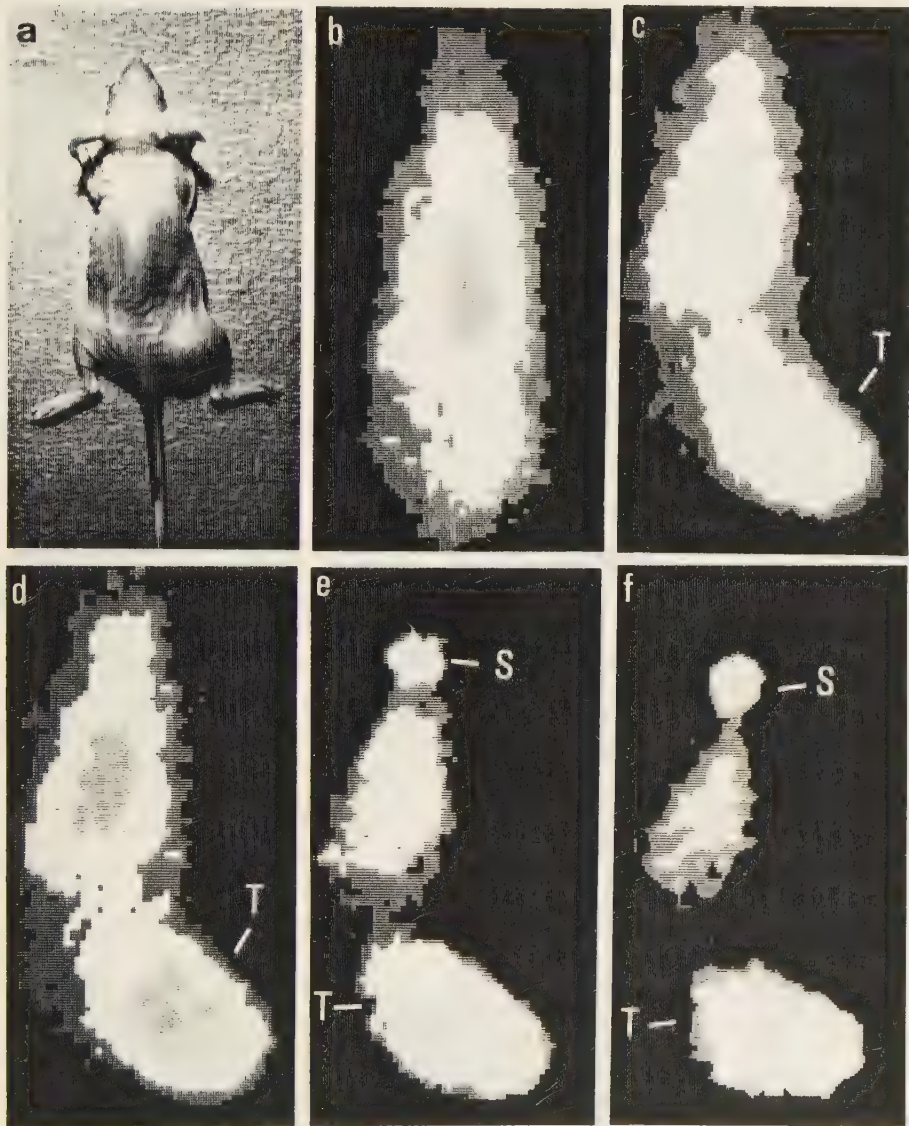


Abb. 7: Ganzkörperszintigramme einer Nacktmaus (a) mit i.m. Gliomtransplantat nach i.v. Injektion von 70 μCi (2.59 MBq) des J 131 -markierten intakten monoklonalen Antikörpers 14 ACl (b) sofort, (c) 24, (d) 48, (e) 72, (f) 96 Stunden nach der Injektion.

Nach 96 Stunden ist der Tumor (T) gut abgegrenzt. Die nicht blockierte Schilddrüse (S) stellt sich mit zunehmenden Zeitverlauf p.i. stärker dar.

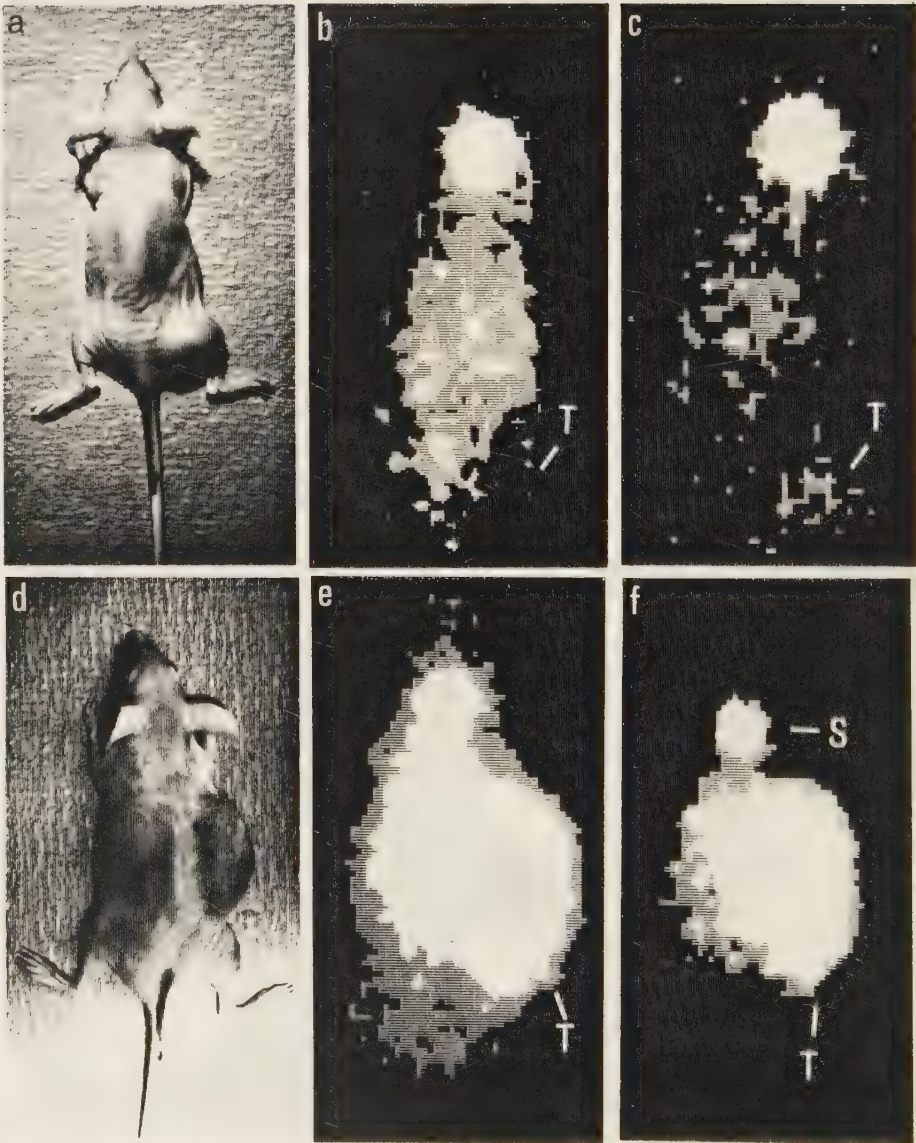


Abb. 8: Ganzkörperszintigramme einer Nacktmaus (a) mit i.m. Gliomtransplantat 48 (b) und 96 Stunden (c) nach i.v. Injektion von 50 μCi (1.85 MBq) des polyklonalen J 131-markierten Maus-IgG. Es ist keine Anreicherung von J 131-IgG im Tumor (T) sichtbar (Schilddrüse (S) nicht blockiert).

Ganzkörperszintigramme einer Nacktmaus (d) mit s.c. Transplantat nach i.v. Injektion von 70 μCi (2.59 MBq) 14 AC1-IgG. Nach 48 Stunden (e) und 96 Stunden (f) ist der Tumor (T) deutlich sichtbar (Schilddrüse (S) nicht blockiert).

Subkutane Tumortransplantate ließen im Vergleich mit intramuskulären Transplantaten trotz anderer Vaskularisationsverhältnisse keinen Unterschied im Akkumulationsverhalten erkennen. Auch hier war der Tumor bereits nach 24 Stunden sichtbar und stellte sich mit zunehmender Zeitdauer aufgrund fallender Untergrundaktivität besser dar (Abb. 8). Tumoren kleineren Durchmessers und Gewichts (ca. 500 - 1000 mg) wurden durch Injektion geringerer Zellmengen induziert und zeigten in der szintigraphischen Darstellung ein abweichendes Verhalten. Sie konnten erst sicher differenziert werden, wenn die in den Organen des Brust- und Bauchraumes befindliche Aktivität weit genug gesunken war, bzw. wenn computerunterstützte Untergrundsubtraktion durchgeführt wurde.

Bei einem Teil der Tiere erfolgte die Applikation durch intraperitoneale Injektion. Nach 24 - 96 Stunden zeigte sich gegenüber der i.v. Injektion kein Unterschied im szintigraphischen Bild der Aktivitätsverteilung. Voraussetzung war jedoch, daß die Antikörperfraktion zur besseren intraperitonealen Resorption in einem größeren Volumen appliziert wurde.

8.2. Antikörperfragmente

Die Lokalisationseigenschaften gliomspezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 wurden ebenfalls an subkutanen und intramuskulären Transplantaten untersucht. In den ersten Experimenten erhielten die Tiere jeweils 40 μCi (1.48 MBq) Antikörper i.v. injiziert. Szintigramme nach 3, bzw. 6 Stunden ließen eine beginnende Einlagerung im Tumor erkennen. Die Zonen mit größter Radioaktivität lagen jedoch im Bereich der Niere und Harnblase (Abb. 9).

Tumoren mit 1 - 2 cm Durchmesser stellten sich bei dieser applizierten Aktivitätsmenge nach 24 Stunden nur schwach dar (Abb. 9). Aufnahmen zu späteren Zeitpunkten konnten keine Verbesserung der Tumorlokalisation erbringen und waren zudem durch sehr lange Aufnahmezeiten aufgrund niedriger Gesamtaktivitäten kaum möglich. Nach Injektion von $F(ab')_2$ -Fragmenten mit einer Aktivität von 100 - 150 μCi (3.7 - 5.55 MBq) kam der Tumor jedoch nach 24 Stunden deutlich zur Darstellung (Abb. 9), während die Untergrundaktivität im Vergleich zum intakten 14 ACL-IgG wesentlich geringer war. 48 Stunden p.i. war eine erhebliche Reduktion der Aktivität des Blutpools zu verzeichnen, was zur klaren Abgrenzbarkeit des Tumors von umgebenden Strukturen beitrug (Abb. 9). Das szintigraphische Bild nach 48 Stunden entsprach bei den $F(ab')_2$ -Fragmenten der Tumordarstellung, die mit intakten Antikörpern nach 96 Stunden erreicht wurde.

8.3. Beeinflussung der Tumordarstellung durch Vorinjektion von nichtradioaktiven monoklonalen Antikörpern

Durch Injektion von 2 mg nichtradioaktivem spezifischem Antikörper 14 ACL (präz. Ascites) jeweils 6-8 Stunden vor der Injektion des markierten intakten Antikörpers konnte gezeigt werden, daß die spezifische Einlagerung des markierten Antikörpers im Tumor, dargestellt im Szintigramm nach 24 Stunden, blockiert werden konnte (Abb. 10). Während sich bei Tieren, die nur den radioaktiven Antikörper erhalten hatten der Tumor, wie beschrieben, nach 24 Stunden bereits differenzieren ließ, konnte bei den vorinjizierten Tieren zwar eine starke Aktivität im Brust- und Bauchraum festgestellt werden, der Tumorbereich wies aber keine nennenswerte Einlagerung radioaktiven Antikörpers auf. Untersuchungen der Zählraten des Tumorbereichs mit der "region- of-interest"-Technik zeigten eine wesentlich

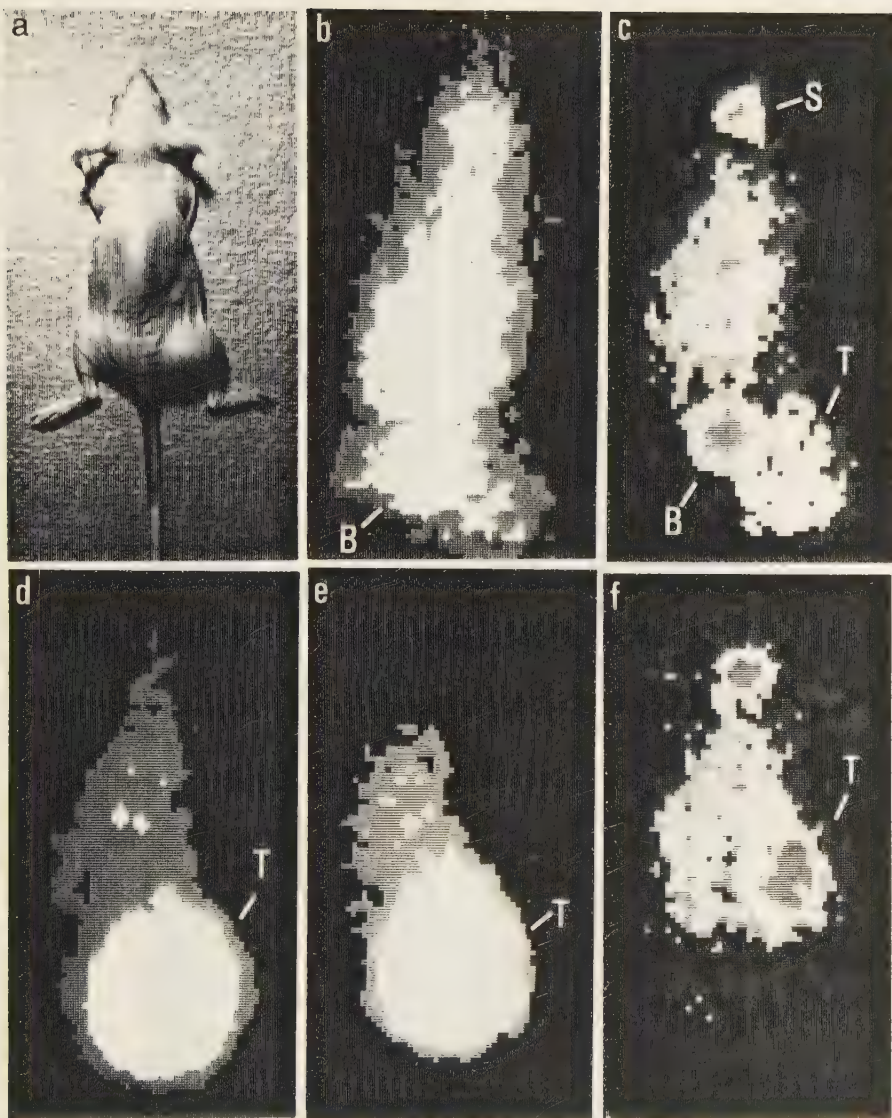


Abb. 9: Ganzkörperszintigramme von Nacktmäusen mit i.m. Gliomtransplantaten (a-e) und s.c. Transplantat (f).

Nach i.v. Injektion von 40 μCi (1.48 MBq) des monoklonalen $^{14}\text{ACl-F(ab')}_2$ stellt sich nach 6 Stunden (b) die Harnblase (B) stark dar. Nach 24 Stunden ist der Tumor (T) schwach sichtbar, Hauptzonen der Aktivität befinden sich weiterhin in Harnblase (B) und in der nicht blockierten Schilddrüse (S).

Nach i.v. Injektion von 150 μCi (5.55 MBq) $^{14}\text{ACl-F(ab')}_2$ ist der Tumor (T) nach 24 Stunden (d) klar abgegrenzt. 48 Stunden (e) p.i. ist die Untergrundaktivität erheblich reduziert (Schilddrüse blockiert). Nach Injektion von 100 μCi (3.7 MBq) $^{14}\text{ACl-F(ab')}_2$ ist das subkutane Transplantat (T) nach 72 Stunden (f) gut sichtbar.

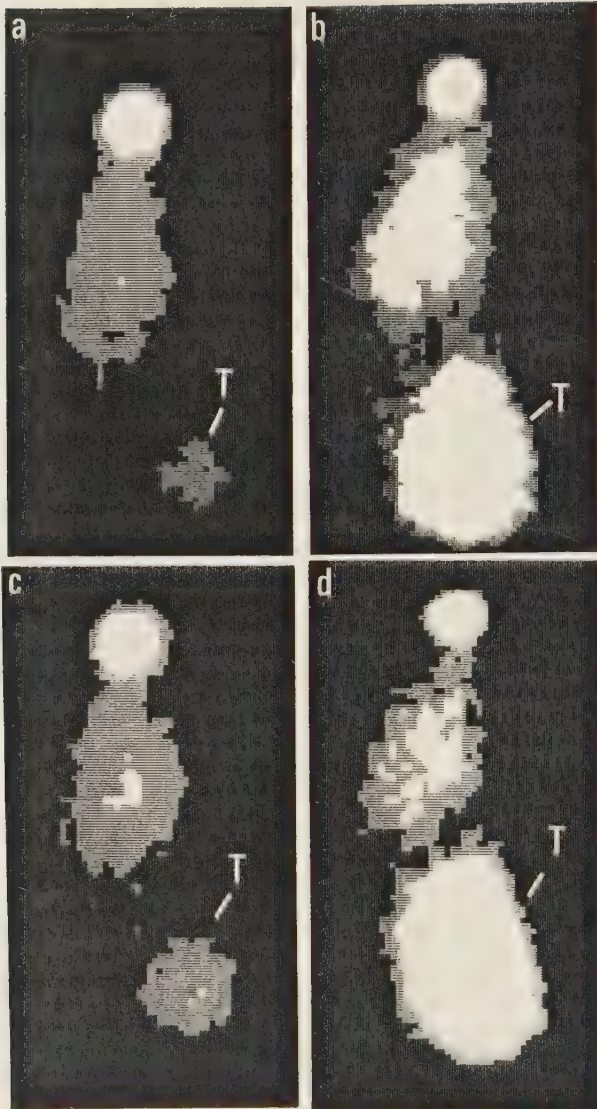


Abb. 10: Ganzkörperszintigramme von 2 Nacktmäusen mit i.m. Gliomtransplantaten.

24-Stunden Szintigramme nach Vorinjektion von 2 mg 14 ACl-IgG (Ascites) i.p. (a) und i.v. Applikation von 70 uCi (2.59 MBq) des J 131-markierten 14 ACl-IgG, bzw. ohne Vorinjektion (b). Die Tumordarstellung ist bei (a) durch den inaktiven Antikörper blockiert, während sich bei (b) der Tumor (T) eindeutig darstellt. 48-Stunden Szintigramme mit (c) und ohne (d) Vorinjektion. Deutlich sichtbar ist bei (c) die verstärkte Einlagerung des radioaktiven Antikörpers im Tumor (T) gegenüber dem 24-Stunden Szintigramm.

geringere Anzahl an Impulsen im Tumor bei der blockierten Gruppe. Nach 48 Stunden konnte eine erhöhte Einlagerung radioaktiven Antikörpers in den Tumor szintigraphisch beobachtet werden, was auf eine zunehmende Lösung des nicht-aktiven Antikörpers vom Tumor und Ersatz durch radioaktiven Antikörper hinweisen dürfte (Abb. 10)

9. Ganzkörpermessungen

Die Bestimmung der Ganzkörperretention der eingesetzten Antikörper und Antikörperfragmente erfolgte mit einem Kleintierganzkörperzähler unter Beziehung der ermittelten Meßwerte auf den unmittelbar nach Injektion des Antikörpers gemessenen Aktivitätswert.

Beim intakten monoklonalen Antikörper 14 ACl fand der Hauptabfall der Ganzkörperaktivität in den ersten 24 Stunden p.i. statt, während die Elimination mit zunehmender Bindung des Antikörpers im Tumor und in unspezifischen Gewebsstrukturen in den darauffolgenden Tagen langsamer vor sich ging (Abb. 11). 24 Stunden p.i. war der Wert der Retention von 100% auf 78% abgesunken, was hauptsächlich auf die Ausscheidung größerer Mengen ungebundener zirkulierender Antikörper des Blutpools und freien aus dem Antikörper abgespaltenen Jods zurückzuführen war. Ein verzögertes Ausscheidungsverhalten mit Retentionswerten von 65%, 57% und 51% nach 48, 72 und 96 Stunden konnte in der weiteren Folge beobachtet werden. Die Halbwertszeit des intakten monoklonalen Antikörpers lag somit bei rund 96 Stunden. In einzelnen Messungen, die auf 7 Tage nach der Applikation ausgedehnt wurden, konnte eine Ganzkörperretention von 35% ermittelt werden.

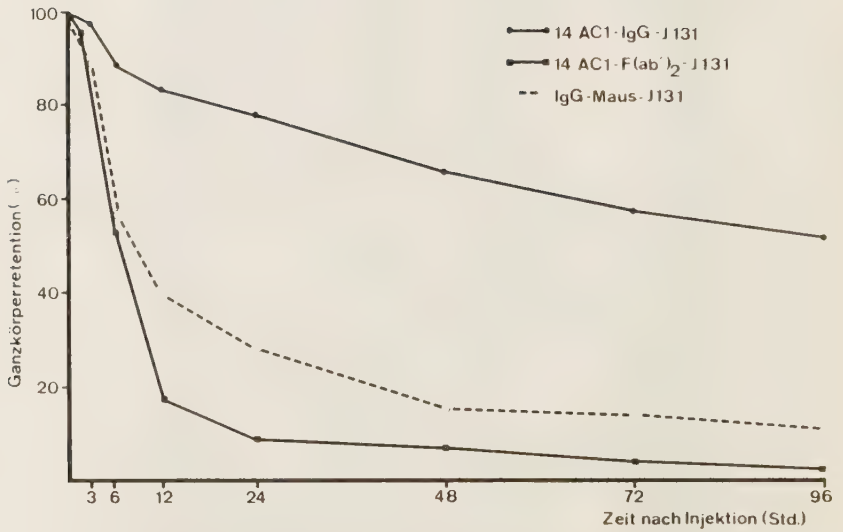


Abb.11: Ganzkörperretention monoklonaler Antikörper, Antikörperfragmente und polyklonaler Kontrollantikörper (Retention in % der Ausgangsaktivität)

Im Gegensatz dazu verlief die Ausscheidung J 131-markierter unspezifischer polyklonaler Kontrollantikörper wesentlich rascher (Abb. 11). Auch hier fand die Hauptelimination in den ersten 24 Stunden statt, wobei bereits 7 Stunden p.i. die Hälfte der verabreichten Antikörper ausgeschieden war. Nach 24 Stunden betrug die Retention nur noch 28.2%. Die weitere Ausscheidungskinetik war mit zunehmender unspezifischer Gewebsbindung der des spezifischen Antikörpers ähnlich.

F(ab')₂-Fragmente des monoklonalen Antikörpers 14 ACl wiesen eine Halbwertszeit von 6 Stunden auf (Abb. 11). Nach 24 Stunden betrug die Ganzkörperretention nur noch 9% der ursprünglich applizierten Aktivität. Im folgenden Zeitraum bis 4 Tage nach Injektion sank die Ganzkörperretention bei nur geringfügiger Ausscheidung nur sehr langsam ab und lag nach 96 Stunden mit 4% deutlich unter den Werten der übrigen untersuchten Antikörper.

10. Verteilungsstudien

10.1. Verteilung intakter monoklonaler und polyklonaler Antikörper

Die Aktivitätskonzentrationen in den Geweben und Tumortransplantaten von Nacktmäusen (n = 3) wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion durch Wiegen und Messen der Proben im Bohrlochszintillationsdetektor bestimmt und als Prozentsatz der verabreichten Dosis/Organ, bzw. als Prozentsatz der verabreichten Dosis/Gramm Gewebe errechnet. Abb. 12 zeigt das unterschiedliche Verteilungsverhalten von J 131-markiertem monoklonalem IgG und polyklonalem Maus-IgG 24, 48, 72 und 96 Stunden nach i.v. Injektion der Antikörper. Das Gewicht der Tumortransplantate reichte von 1.2 - 4.5 g, wobei größere Tumoren ausgedehnte zentrale Nekrosen aufwiesen.

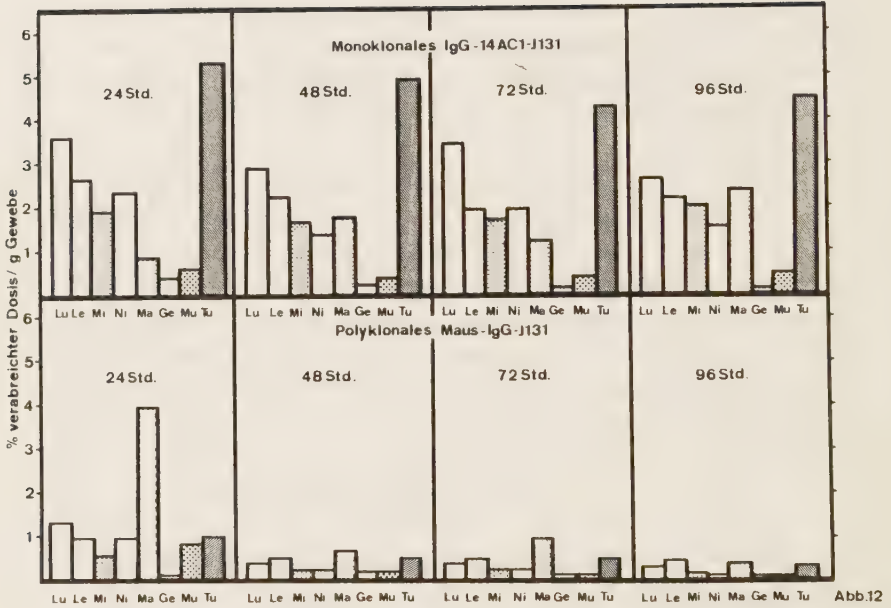


Abb. 12: Aktivitätskonzentrationen in den Organen und im Tumor von Nacktmäusen (n=3) mit i.m. Gliomtransplantaten in Abhängigkeit von der Zeit nach der i.v. Injektion des J 131-markierten monoklonalen Antikörpers 14AC1 und J 131-markierter polyklonaler Maus-Immunglobuline.

(Angabe als Mittelwerte in % der applizierten Aktivität/g Gewebe; Lu = Lunge, Le = Leber, Mi = Milz, Ni = Niere, Ma = Magen, Ge = Gehirn, Mu = Muskel, Tu = Tumor)

Die Aktivitätskonzentration im Tumor lag 96 Stunden nach der Applikation beim spezifischen Antikörper 14 AC1 bei 18.84% (17.49 - 20.20) der verabreichten Dosis/Gesamtumor bzw. bei 4.72% (4.47 - 4.91)/g Tumorgewebe. Das Maximum der Radioaktivität im Tumor war mit 5.52% (5.18 - 5.77)/g bereits nach 24 Stunden erreicht, was auf eine Hauptakkumulationsphase markierter spezifischer Antikörper in den ersten 24 Stunden hinweist (Abb. 12). Die spezifischen Aktivitätskonzentrationen in den wichtigsten Organen sanken im Zeitverlauf nur im geringen Umfang ab (Abb. 12, 13), so daß nach 96 Stunden noch erhebliche Restaktivitäten in Leber, Milz, Niere und Lunge vorlagen. Dies läßt auf eine unspezifische Bindung von intakten Antikörpern in gut durchbluteten Organen mit Metabolisierungs- und Ausscheidungsfunktionen schließen.

Die Blutaktivität war nach 96 Stunden auf einen Wert von 4.61% (4.52 - 5.13)/g abgesunken (Abb. 13). Daher konnte auch der Tumor im 96-Stunden Szintigramm in erster Linie durch die reduzierte Blutpoolaktivität bei relativ gleichbleibender Tumoraktivität gut differenziert werden. Die Lunge wies aufgrund ihres hohen Blutgehaltes trotz Ausblutens der Tiere vor der Präparation auch nach 96 Stunden noch hohe Aktivitätskonzentrationen auf (2.6% (2.41 - 2.82) der verabreichten Dosis/g). Aus Abb. 12 kann entnommen werden, daß die Radioaktivität des Magens (2.4% (1.84 - 3.13) der verabreichten Dosis/g) nach 96 Stunden sehr hoch war, was auf aktive Sekretion freien, aus dem Antikörper abgespaltenen Jodids zurückzuführen sein dürfte. Gehirn und Muskulatur enthielten nach 96 Stunden die niedrigsten Konzentrationen an Aktivität (0.47% (0.37 - 0.58) Dosis/g Muskel; 0.07% (0.02 - 0.13) Dosis/g Gehirn).

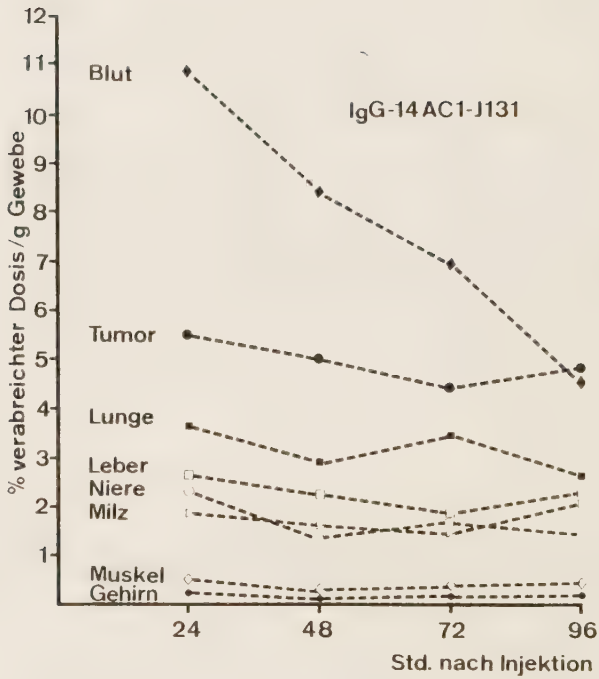


Abb. 13: Aktivitätskonzentrationen in den Organen und im Tumor von Nacktmäusen mit i.m. Gliomtransplantaten in Abhängigkeit von der Zeit nach der Injektion des J 131-markierten monoklonalen Antikörpers 14 AC1.

(Angabe in % der verabreichten Dosis /g Gewebe)

Die absolut höchste Radioaktivität/g Gewebe wies nach 96 Stunden bei nicht blockierten Tieren die Schilddrüse durch die starke Jodspeicherung auf (1878% (1608 - 2253) Dosis/g). Da größere intramuskuläre Tumoren ausgedehnte Nekroseareale enthielten, wurde bei einigen Tieren Nekrose- und Proliferationszone des Tumors getrennt gemessen. Hier konnten im Verhältnis pro Gramm Tumorgewebe erheblich mehr Impulse im Proliferationsbereich (z.B. 0.949 g mit 689922 cpm) als im nekrotischen Gewebe (z.B. 1.317 g mit 479254 cpm) gezählt werden.

Tumor und Gewebe von Versuchstieren, die über 7 Tage nach der Injektion hinaus gehalten wurden, wiesen eine zwar insgesamt verminderte, aber immer noch für die szintigraphische Darstellung ausreichende Radioaktivität auf.

Für den unspezifischen Maus-Antikörper konnte eine in den Organen, wie im Tumor gleichmäßig niedrige Verteilung der Radioaktivität nach 24 Stunden festgestellt werden (Abb. 12). Eine Ausnahme bildete der Magen, der aufgrund starker Dejodierung des Antikörpers hohe Aktivitäten zeigte (Abb. 12). Allgemein waren die Werte aber im Vergleich zum spezifischen Antikörper wesentlich niedriger durch die rasche Ausscheidung innerhalb der ersten 24 Stunden und sie sanken auch im Zeitverlauf weiter ab. 96 Stunden p.i. lagen die Tumor- und Organwerte unter 0.5% der verabreichten Dosis pro Gramm Gewebe, während im Tumor beim spezifischen Antikörper 15mal höhere Werte vorlagen (Abb. 12).

10.2. Verteilung von Antikörperfragmenten

F(ab')₂-Fragmente des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 zeigten im Vergleich zum intakten Antikörper im Zeitverlauf von 48 Stunden p.i. ein anderes biokinetisches Verhalten. Auch hier waren nach 24 Stunden die höchsten Aktivitätskonzentrationen in den Organen und im Tumor erreicht (Abb. 14).

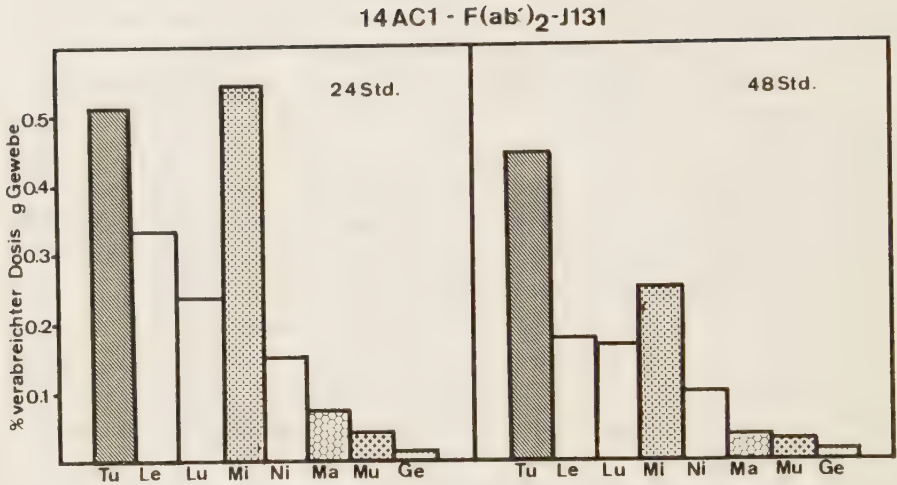


Abb. 14: Aktivitätskonzentrationen in den Organen und im Tumor von Nacktmäusen mit i.m. Gliomtransplantaten nach i.v. Injektion von J 131-markierten F(ab')₂-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers 14 AC1.

(Mittelwerte (n = 3) in % der applizierten Aktivität /g Gewebe;
Tu = Tumor, Le = Leber, Lu = Lunge, Mi = Milz, Ni = Niere, Ma = Magen, Mu = Muskel, Ge = Gehirn)

Nach 48 Stunden entsprach nicht nur die szintigraphische Darstellung dem Bild des intakten Antikörpers nach 96 Stunden, sondern auch das Tumor/Blut-Verhältnis (Abb. 15). Der Wert der Blutaktivität war schon nach 48 Stunden niedriger als der des Tumors, was nach diesem Zeitraum zu einem Tumor/Blut-Quotienten von 1.07 führte (Abb. 15). Intakte Antikörper erreichten Werte über 1 erst nach 96 Stunden. Auch die Organaktivitäten lagen mit Ausnahme der Milz im Vergleich zum Tumor durch geringere unspezifische Gewebsbindung niedriger als beim intakten Antikörper (Abb. 14). In den Gewebe/Blut-Quotienten der übrigen Organe bei $F(ab')_2$ -Fragmenten nach 48 Stunden und bei intakten monoklonalen Antikörpern und polyklonalen Kontrollantikörpern nach 96 Stunden waren deutliche Unterschiede zwischen Fragmenten und intakten Antikörpern festzustellen (Tab. 2).

10. 3. Verteilungsmuster J 131-markierter intakter monoklonaler Antikörper in Nacktmäusen mit intracerebralen Gliomtransplantaten

An 10 Tieren mit intracerebralen Gliomtransplantaten wurden Lokalisationsstudien mit spezifischen intakten Antikörpern durchgeführt. Vor dem Versuch erhielten alle Tiere Irenat^(R) zur Schilddrüsenblockade, um eventuelle Überlagerungen aktiver Zonen des Kopfbereiches und der Schilddrüse zu vermeiden. Während der gesamten Beobachtungszeit bis 96 Stunden nach der Applikation des intakten Antikörpers konnte keine szintigraphische Darstellung der Tumortransplantate erzielt werden.

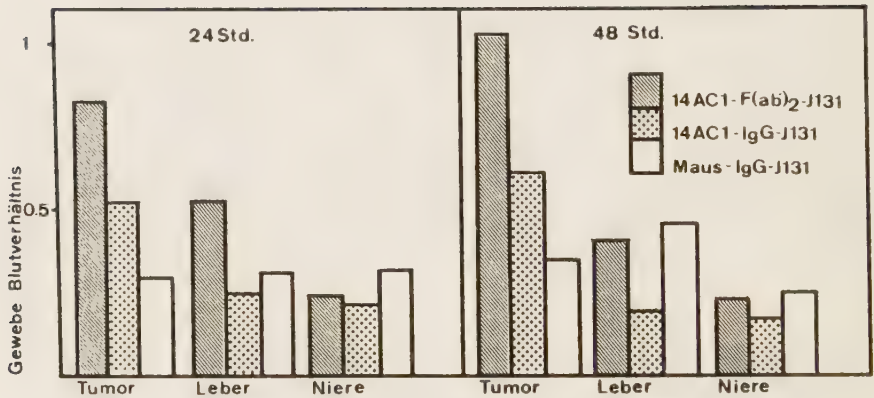


Abb. 15: Gewebe/Blut-Quotient von Tumor, Leber und Niere für radioaktiv markierte monoklonale intakte Antikörper (14 AC1), F(ab')₂-Fragmente und polyklonales Maus-IgG 24 und 48 Stunden nach der i.v. Injektion in Nacktmäuse mit i.m. Gliomtransplantaten. (Quotient aus % applizierter Dosis pro g Gewebe / % applizierter Dosis pro g Blut.)

Tab. 2 : Gewebe/Blut-Quotient für jodmarkierte intakte monoklonale Antikörper (14 AC1), F(ab')₂-Fragmente und polyklonale Maus-Antikörper 48 und 96 Stunden nach i.v. Injektion in Nacktmäuse mit i.m. Gliom-transplantaten.
(Gewebe/Blut-Quotient errechnet aus Prozent der verabreichten Dosis pro g Gewebe / Prozent der verabreichten Dosis pro g Blut)

48 STUNDEN

Gewebe	14 AC1-IgG J 131	14 AC1-F(ab') ₂ J 131	Maus-IgG J 131
Tumor	0.59	1.07	0.34
Leber	0.18	0.40	0.45
Milz	0.18	0.60	0.37
Niere	0.16	0.22	0.24
Magen	0.20	0.07	0.68
Lunge	0.34	0.38	0.43
Muskel	0.03	0.05	0.27
Gehirn	0.02	0.01	0.11

96 STUNDEN

Gewebe	14 AC1-IgG J 131	Maus-IgG J 131
Tumor	1.02	0.65
Leber	0.47	0.83
Milz	0.44	0.25
Niere	0.32	0.32
Magen	0.52	0.90
Lunge	0.56	0.62
Muskel	0.10	0.11
Gehirn	0.01	0.02

Speziell definierte Regionen im Szintigramm, die mit der "region-of-interest"-Technik um den Kopfbereich gezogen wurden, zeigten bei Tieren mit i.c. Transplantaten eine höhere relative Aktivitätskonzentration in der Kopfregion als bei Tieren ohne i.c. Transplantate (72 Stunden p.i.: Tumortiere: 33 Impulse/Matrixelement; Tiere ohne i.c. Transplantate: 20 Impulse/Matrixelement). Nach Messung der präparierten Tumoren und Organe konnten im Tumor nach 72 Stunden gegenüber den Hauptorganen (Leber, Niere, Lunge) die höchsten Aktivitäten mit 5.58% (2.17 - 12.9) der verabreichten Dosis pro g ermittelt werden. Allein die Blutaktivitäten lagen bis auf eine Ausnahme noch deutlich über den Tumorergebnissen (72 Stunden p.i.: 7.48% (3.92 - 12.49) verabreichter Dosis pro g Blut). Die Werte für die nach Präparation des Tumortransplantats verbliebene Hirnmasse waren mit 1.02% (0.15 - 2.32) der appl. Dosis/g höher als bei Tieren ohne i.c. Tumoren (0.07% (0.02 - 0.13)/g).

E. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß der monoklonale Antikörper 14 AC1 und seine $F(ab')_2$ -Fragmente nach radioaktiver Markierung mit Jod-131 erfolgreich zur radioimmunszintigraphischen Darstellung von experimentellen Rattengliomen eingesetzt werden konnten.

Der Antikörper reagierte bei laufend durchgeführten Spezifitätsüberprüfungen vorzugsweise mit Tumorzellen der Gliomzelllinie 79FR-G-41. Die Antikörperproduktion konnte durch Reklonierung in regelmäßigen Zeitabständen zur Stabilisierung produzierender Hybridomklone gewährleistet werden. Zur Gewinnung größerer Immunglobulinmengen erwiesen sich immundefiziente Nacktmäuse als besonders geeignet. Neben einer schnelleren in vivo-Anreicherung von Ascitesflüssigkeit lag die Angehrate intraperitoneal transplanteder Hybridomzellen aufgrund der besonderen immunologischen Verhältnisse der Nacktmaus bei nahezu 100%, wobei in der Regel auch größere Ascitesmengen gewonnen werden konnten.

Die mit Hilfe der Ammoniumsulfatpräzipitation und der Protein-A-Säule angereicherten monoklonalen Immunglobuline konnten mit der doppelten Immundiffusion nach Ouchterlony (1962) als IgG, Subklasse IgG_{2a} identifiziert werden. Intakte monoklonale Antikörper wurden mit Pepsin bei einem Enzym : Substratverhältnis von 1:20 mit guter Ausbeute an $F(ab')_2$ -Fragmenten proteolytisch gespalten. Nisonoff et al. (1961) setzten zur Spaltung von polyklonalem IgG Enzym im Verhältnis 1:50 ein, während Lamoyi et al. (1983) bei einem Verhältnis von 1:33 für monoklonales Maus-IgG optimale Resultate erzielten. Die zur Anreicherung der Immunglobuline verwendete Protein-A-Säule erwies sich auch als geeignet zur Trennung der $F(ab')_2$ -Fragmente von Fc-Fragmenten und ungespaltenen Antikörpern. Jedoch konnten nach einmaligem Säulendurchlauf häufig noch Spuren intakter Immunglobuline in der $F(ab')_2$ -Fraktion nachgewiesen werden

(Khaw et al. (1984), so daß sich ein zweiter Säulendurchlauf zur weitgehenden Reinigung der Proben bewährte.

In der SDS-Gelelektrophorese wurde für Fragmente unter nichtreduzierenden Laufbedingungen eine charakteristische Bande erhalten, die deutlich unter dem Molekulargewichtsbereich von intakten Antikörpern lag.

Zur besseren Lagerung gereinigter und konzentrierter Antikörperproben wurde präzipitierter Ascites ohne größere Verluste an Immunreaktivität gefriergetrocknet. Die Beobachtung, daß nach Lyophilisation von monoklonalen Antikörpern irreversible Denaturierungen der Proteine auftreten (Goding, 1983), konnte nicht bestätigt werden.

Versuche zur Jod-131-Markierung zeigten eine unterschiedliche Empfindlichkeit der eingesetzten Immunglobuline gegenüber der Chloramin-T- und der Jodogen-Markierung. Bei $F(ab')_2$ -Fragmenten konnten im allgemeinen geringere Markierungsausbeuten mit der Chloramin-T-Methode erzielt werden (DeNardo et al., 1985) als bei intakten Immunglobulinen. Zusätzlich konnte nach in vivo-Applikation von Fragmenten, die mit dieser Methode markiert worden waren, eine geringere Tumoranreicherung bei stark beschleunigter Ausscheidung festgestellt werden. Chatal et al. (1983) wiesen im Vergleich zu Jodogen-markierten Antikörpern eine reduzierte in vivo-Immunreaktivität Chloramin-T-markierter Antikörper mit stärkerer Dejodierung nach. Auch schädigende Wirkungen des Chloramin-T vor allem auf $F(ab')_2$ -Fragmente durch Reduktion zu Fab-Fragmenten oder zu kleineren Peptidbruchstücken können auftreten. Mit Jodogen dagegen konnten auch bei längeren Reaktionszeiten sowohl mit intakten Antikörpern, als auch mit Fragmenten gute Markierungsausbeuten erzielt werden.

Die Antikörperfraktionen enthielten unmittelbar nach der Markierung, wie sich chromatographisch zeigte, nur geringe Mengen freien Jods. Nach längerer Lagerzeit bei 4°C konnte jedoch ein Anstieg des Jod-"Peaks" und eine beträchtlich reduzierte in vivo-Stabilität und Immunreaktivität nachgewiesen werden. Reynold et al. (1985) ermittelten nach Lagerung markierter Antikörper eine Korrelation zwischen der Konzentration an Radioaktivität und einer Dejodierung des Antikörpers, die bei hochaktiven Proben zu erheblichen Verlusten an immunologischer Aktivität aufgrund Radiolyse antigenbindender Regionen führte.

Wie mit Hilfe autoradiographischer Untersuchungen und Absorptionstests gezeigt werden konnte, wurde die Bindungsfähigkeit intakter Antikörper und $F(ab')_2$ -Fragmente durch die radioaktive Markierung kaum beeinträchtigt. Jodierte monoklonale Antikörper zeigten im quantitativen Absorptionstest im Bereich hoher Gliomzellzahlen einen Abfall der Absorptionskurve durch erhöhte Antikörperbindung. Ähnliche Resultate erzielten Stavrou et al. (1983) mit nichtmarkierten Antikörpern derselben Fusionsreihe in verschiedenen Absorptionsstudien. Dies spricht für eine weitestgehend erhaltene in vitro-Immunreaktivität des Antikörpers nach der Markierung mit Jod-131. Das Auftreten von Verlusten an immunologischer Aktivität monoklonaler Maus-Antikörper als Folge der Einlagerung von radioaktiven Isotopen in das Antikörpermolekül ist eine seit langem bekannte Tatsache (Keenan et al., 1985; Pimm et al., 1985c; Zimmer et al., 1985). In neueren Studien mit Indium-111 (Buchsbaum et al., 1985; Fawwaz et al., 1985; Perkins et al., 1985) konnte mit speziellen Markierungsmethoden ein höherer Prozentsatz an immunologisch aktivem Immunglobulin erzielt werden als mit Jod-131.

Die Untersuchung der Lokalisierungseigenschaften intravenös applizierter monoklonaler Antikörper und ihrer $F(ab')_2$ -Fragmente an Nacktmäusen mit Gliomtransplantaten zeigte eindeutig, daß eine selektive Anreicherung des Antikörpers im Tumor im Vergleich zu unspezifischen Kontrollantikörpern erfolgte. Es konnten wesentlich höhere Aktivitätskonzentrationen im Tumor im Vergleich zu normalen Gewebsstrukturen gemessen werden. Für intakte monoklonale Antikörper wurde nach 24 Stunden die 6-fache Aktivitätskonzentration in Prozent der verabreichten Dosis pro g Tumorgewebe im Vergleich zum unspezifischen Kontrollantikörper erreicht. Sie stieg im Zeitverlauf nach 96 Stunden auf das 15-fache an und führte zu einer klaren szintigraphischen Darstellung des Tumors. Ballou et al. (1984) erzielten nach 72 Stunden eine 6-fache Anreicherung, während Wilbanks et al. (1981) nach 24 Stunden nur eine 1.7-fache Aktivitätskonzentration für den spezifischen Antikörper ermittelten. Andere Autoren beschrieben wesentlich höhere Werte für intakte Antikörper (Hedin et al. (1982): 25-fache Anreicherung; Epenetos et al. (1982): 40-fache Anreicherung). Als Untergrenze für eine erfolgreiche Lokalisation wurde von Keenan et al. (1985) ein Tumor/Hintergrundverhältnis von 2:1 angegeben, das bei kleineren Tumoren 5:1 und mehr betragen sollte. Eine mögliche Ursache für die im Vergleich zu anderen Studien niedrigen Aktivitätskonzentrationen war auch in der speziellen Gewebsstruktur der hier transplantierten experimentellen Gliome begründet. Es handelte sich bei den Transplantaten durchwegs um relativ große rasch wachsende Tumoren (Gewicht nach 14-20 Tagen bis 4.5 g) mit einem relativ geringen Anteil an proliferierendem Tumorgewebe aber ausgedehnten Nekrosearealen und Zystenbildungen. Die in der Nekrosezone gemessene Aktivität lag wesentlich niedriger als in der Proliferationszone. Bei der Berechnung der Aktivität

in Prozent der applizierten Dosis pro g Gewebe ergaben sich daher aufgrund der hohen Gewichtsanteile des schwachaktiven nekrotischen Tumorgewebes ungünstigere Werte pro Gramm. Das Vorliegen starker subkapsulärer Aktivitätskonzentrationen in der peripheren Tumorphilisationszone nach i.v. Applikation tumorspezifischer Antikörper wurde von Moshakis et al. (1981b), sowie von Pimm et al. (1982) durch autoradiographische Untersuchungen belegt. Hierbei zeigte sich, daß Tumornekrosen und bindegewebige Strukturen nur in geringem Maße aktiven Antikörper einlagerten. Als Hauptursache dafür dürfte die verminderte Blutversorgung nekrotischer Anteile in Frage kommen.

Nach 24 Stunden lagen auch beim unspezifischen Antikörper im Verhältnis zum Normalgewebe relativ hohe Tumorkonzentrationen vor, die sicher als rein durchblutungsbedingter Effekt aufgefaßt werden können. Dieser war nur in der ersten Phase nach der Applikation bei hoher Blutpoolaktivität von Bedeutung. Im weiteren Zeitverlauf reduzierte sich die Tumorkonzentration auf ein Minimum, so daß zu keinem Zeitpunkt eine szintigraphische Darstellung des Tumors erreicht wurde. Einige Autoren beschrieben eine mögliche unspezifische Akkumulation von Antikörpern im Tumorgewebe aufgrund spezieller funktioneller Eigenheiten, wie reicher Vaskularisation, erweiterten Extracellulärspaces und verminderter Lymphdrainage etc. (Bale et al., 1980; Sfakianakis et al., 1982).

Mit $F(ab')_2$ -Fragmenten des monoklonalen Antikörpers 14A1 konnte bereits nach 48 Stunden eine optimale Darstellung des Tumors erzielt werden, die dem 96-Stunden Szintigramm intakter monoklonaler Antikörper entsprach. Von verschiedenen Autoren wurden vergleichende Studien der Lokalisierungseigenschaften intakter Antikörper und Fragmente durchgeführt. Die für intakte Antikörper beschriebenen Zeiten von der Injektion bis zur adäquaten Lokalisierung variieren zwischen 3 bis 11 Tagen.

Herlyn et al. (1983) sowie Wahl et al. (1983) konnten für $F(ab')_2$ -Fragmente eine erhöhte Aufnahme im Tumorgewebe im Vergleich zum intakten IgG ermitteln, die nach 48 Stunden zu einer guten szintigraphischen Darstellung des Tumors führte. In klinischen Studien wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (Moldofsky et al., 1983; Chatal et al., 1984). Nach Applikation von monovalenten Fab-Fragmenten wurden nur in wenigen Untersuchungen gute Resultate erzielt (Buchegger et al., 1982; Beaumier et al., 1985), während in den meisten Fällen Tumortransplantate aufgrund der extrem beschleunigten Ausscheidung nicht lokalisiert werden konnten.

In den durchgeführten Versuchen mit $F(ab')_2$ -Fragmenten war jedoch eine Applikation relativ hoher Dosen notwendig, um zu einer für die szintigraphische Darstellung ausreichenden Tumorabsättigung zu gelangen. Im Zeitraum von 24 Stunden p.i., wie Ganzkörpermessungen und Verteilungsstudien zeigten, erfolgte einerseits die Haupteinlagerung in den Tumor, andererseits vor allem bei Fragmenten die Hauptausscheidung aus dem Organismus. Die Einlagerung in das Tumorgewebe innerhalb weniger Stunden nach der Injektion konnte auch durch spezifische Blockade des Tumors mit "kalten" monoklonalen Antikörpern 6 Stunden vor der Injektion des markierten Antikörpers demonstriert werden. Moshakis et al. (1981b) sowie Bourdon et al. (1984) gelangten bei Blockierungsversuchen zu ähnlichen Ergebnissen.

Die vaskularisationsabhängige Gewebseinlagerung von Antikörpern des Blutpools mit erhöhter Bindung im Tumorgewebe wurde in den ersten 24 Stunden von einer starken Ausscheidung aus dem Organismus begleitet. Gleichzeitige Instabilitäten von Antikörpern machten sich insbesondere bei Fragmenten ebenfalls in den ersten 24 Stunden p.i. besonders bemerkbar (Pimm et al., 1985c). Goodwin et al. (1985) berichteten von einer Dejodierungsrate von 80% bei intakten

Antikörpern innerhalb der ersten 24 Stunden, während Carrasquillo et al. (1981) 30% Dejodierung in Patientenstudien feststellten. Indium-111-markierte Antikörper sollen dagegen eine höhere in vivo-Stabilität besitzen und damit auch länger im Organismus verweilen (Goodwin et al., 1985; Buchsbaum et al., 1985).

Andererseits zeigten die von manchen Autoren (Colcher et al., 1984) beschriebenen langen Retentionszeiten intakter jodmarkierter Antikörper auch eine hohe Dejodierungsresistenz nach erfolgter Gewebs- und Tumorbinding. Als Halbwertszeiten wurden für intakte Antikörper 3 bis 10 Tage angegeben (Ballou et al., 1985), während Fragmente eine wesentlich kürzere Retention im Organismus aufwiesen. Larson et al. (1983) konnten für monovalente Fab-Fragmente eine Plasmahalbwertszeit von nur 83 Minuten ermitteln. Die Halbwertszeit bivalenter Fragmente bewegte sich dagegen im Zeitraum von 24 Stunden (Wahl et al., 1983). In Verbindung mit einer erhöhten Ausscheidungsrate von $F(ab')_2$ -Fragmenten wurde von Wahl et al. (1983) auch eine geringere Fixation der Antikörperfragmente im Tumorgewebe ermittelt, die zum rascheren Absinken der Aktivitätskonzentration im Tumor führte.

Als kritische Organe mit höchsten Antikörperkonzentrationen auch nach 96 Stunden konnten für intaktes IgG Leber, Niere und Lunge, sowie bei nichtblockierten Tieren die Schilddrüse ermittelt werden. Die Intensität der Schilddrüsen-darstellung im Szintigramm wurde als Maß für die in vivo-Dejodierung angesehen. Die Konzentrationen im Magen waren bei Fragmenten und intakten Antikörpern beachtlich, wobei sicher eine aktive Sekretion abgespaltenen Jods Ursache dafür war (Scheinberg et al., 1983). Während bei $F(ab')_2$ -Fragmenten eine Reduktion der Organaktivitäten im Zeitverlauf zu verzeichnen war, veränderte sich die Konzentration in den Hauptorganen nach Injektion intakter Antikörper

nur geringfügig. Neben rein durchblutungsbedingter Akkumulation waren beim intakten IgG unspezifische Gewebsbindungen wesentlicher Grund für diese Aktivitätskonzentrationen.

In Versuchen mit intracerebralen Gliomtransplantaten konnte durch Messung der Radioaktivität eine Anreicherung markierter intakter monoklonaler Antikörper im Tumortransplantat nachgewiesen werden. Dies zeigte eindeutig, daß die Transplantate für parenteral applizierte Immunglobuline permeabel waren, wobei aber eine eventuelle Schädigung der Kontinuität der Blut/Hirnschranke durch die Manipulation bei der Tumortransplantation als zusätzlicher Faktor in Betracht zu ziehen war. Im Gegensatz zu Tieren ohne Tumor, deren Gehirn nur schwache Aktivitäten aufwies, lagen bei den transplantierten Tieren höhere Werte für die nach Präparation verbliebene Hirnmasse vor. Bourdon et al. (1984) zeigten, daß xenotransplantierte humane Gliome für radioaktiv markierte monoklonale Antikörper zugänglich waren. Die szintigraphische Darstellung der Transplantate gelang jedoch nicht, da die Größe der Tumoren unter dem Auflösungsvermögen der eingesetzten Gammakamera lag.

Die erzielten Ergebnisse lassen einige Rückschlüsse auf die Anwendungsmöglichkeiten monoklonaler Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene zu. Die Radioimmunszintigraphie ermöglicht im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden eine frühe und effektive Erfassung auch kleiner Tumoren, sowie eine zuverlässige postoperative Überwachung. Entscheidende Kriterien dafür sind neben einer gewissen Tumorgröße vor allem die Durchblutungsrate des Tumors und die Dichte der antigenen Determinanten auf der Tumorzelloberfläche, um eine für die Szintigraphie ausreichende Akkumulation des Antikörpers zu erzielen.

Eine weitere Voraussetzung für eine szintigraphische Tumordarstellung stellt die effektive in vivo-Halbwertszeit der Antikörper in biologisch aktiver Form dar, wobei eine gewisse Persistenz und entsprechende Stabilität im Tumor bei möglichst rascher Ausscheidung aus Nicht-Tumorgewebe erforderlich ist. Besonders nach Applikation intakter monoklonaler Antikörper stellt die starke Untergrundaktivität ein Problem für die Aufdeckung kleinerer Tumorherde dar (Bradwell et al., 1985). Neben der zur Abhilfe entwickelten Doppelisotopentechnik (Pessman et al., 1957), die einige Fehlerquellen beinhaltet (Perkins et al., 1984), wurde auch der Einsatz hochauflösender bildgebender Systeme (Tomoszintigraphie, SPECT ("Single photon emission tomographie"); Rollo et al., 1980; Mach et al., 1981) empfohlen. Diese der üblichen planaren Aufnahmetechnik überlegenen Systeme sind aufgrund der komplizierten apparativen Ausstattung zum augenblicklichen Zeitpunkt nicht für den Routineeinsatz verfügbar.

Daher bieten sich bivalente Fragmente monoklonaler Antikörper gerade für die Diagnostik an. Durch das Fehlen der Fc-Region besitzen $F(ab')_2$ -Fragmente andere pharmakologische Eigenschaften als intakte Antikörper. Dabei sind die geringere Antigenität, fehlende Immunkomplexbildung und besonders die reduzierte unspezifische Gewebsbindung z.B. durch Makrophagenfixation an Fc-Rezeptoren hervorzuheben, während andererseits die Bindungsavidität durch die bivalente Bindungsfähigkeit den intakten Antikörpern entspricht (Sfakianakis et al., 1982; Scheinberg et al., 1983). Diese verminderte unspezifische Retention im Organismus in Kombination mit der erhöhten Ausscheidungsrate der leichter nierendängigen Fragmente macht sie für die Diagnostik zu geeigneten Trägern für Radioisotope, wobei mit der klinischen Anwendung auch der Vorteil einer reduzierten Strahlenbelastung des Patienten verbunden ist.

Intracerebrale Tumoren weisen aufgrund ihrer Lokalisation funktionelle Besonderheiten auf, die für die Radioimmunszintigraphie von großer Bedeutung sind. Da im allgemeinen der Zugang zum ZNS für makromolekulare Substanzen durch die Blut/Hirnschranke erschwert bis unmöglich ist, finden sich bei Tumorprozessen trotz Schädigung der Schrankenfunktion um den infiltrierenden Tumor parenteral applizierte Immunglobuline in geringerer Konzentration als bei Tumoren mit extracerebraler Lokalisation. Daher könnte mit niedrigmolekularen $F(ab)_2$ -Fragmenten infolge ihrer besseren Kapillargängigkeit eine höhere Antikörperkonzentration in ZNS-Tumoren erzielt werden. Von Bullard et al. (1984) durchgeführte Studien mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern zeigten zusätzlich den Wert hyperosmolarer Stoffe zur vorübergehenden Unterbrechung der Schrankenfunktion in Verbindung mit regionalen intraarteriellen Applikationstechniken. Die mit Fragmenten nach kürzerer Zeit erreichbare Akkumulation im Tumorgewebe erfordert jedoch auch in Hinblick auf die besonderen Eigenheiten des ZNS hohe Antikörperdosen.

Gliomspezifische monoklonale Antikörper in Verbindung mit verschiedenen Radioisotopen könnten auch für die Therapie von Gliomen Bedeutung haben. Voraussetzung dafür ist, wie bereits für die Diagnostik erwähnt, daß Antikörper in ausreichenden Mengen den Tumor im Gehirn erreichen und dort eine gewisse Zeit persistieren um optimal wirksame Strahlendosen zu erreichen. Die lange effektive in vivo-Überlebenszeit und die hohe Stabilität macht intakte Antikörper zu geeigneten Trägern für radiotherapeutische Dosen von Isotopen. Dabei ist die Toxizität als Ergebnis zirkulierender Radioaktivität sowohl dosisabhängig und somit dosislimitierend (Colcher et al., 1984).

Experimentelle Therapieversuche mit J 131-markierten Antikörpern von Badger et al. (1985) und Jones et al. (1985) führten zu einer Regression der Tumortransplantate bei einem hohen Prozentsatz der Tiere. Neben der Frage des geeigneten Isotops, stellt sich für den therapeutischen Einsatz auch das Problem der Heterogenität von Tumoren, das durch die Applikation von Antikörpermischungen zur Absättigung möglichst vieler Bindungsstellen gelöst werden könnte. In Verbindung mit geeigneten Radioisotopen dürfte jedoch, als Vorteil gegenüber den Immunotoxinen, die Strahlungswirkung des Antikörper auf benachbarte Tumorzellen ohne Zielantigen ausreichen, um sowohl antigenpositive wie negative Zellen zu eliminieren. Die Radioimmuntherapie bietet dabei auch den Vorteil eines "Monitorings" des Therapieeffektes mit üblichen szintigraphischen Methoden durch Applikation desselben monoklonalen Antikörpers in subtherapeutischer Dosis.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Das Verteilungsverhalten und die Tumoraufnahme radioaktiv markierter gliomspezifischer monoklonaler Antikörper (14AC1) und ihrer $F(ab')_2$ -Fragmente wurde in Nacktmäusen mit Gliomtransplantaten untersucht, die durch Inokulation von 79FR-G-41 Zellen erzeugt wurden. $F(ab')_2$ -Fragmente wurden durch proteolytische Spaltung mit Pepsin gewonnen. Angereicherter monoklonaler 14 AC1 Antikörper vom IgG_{2a} Isotyp, Fragmente und normales Maus-Immunglobulin wurden unter Verwendung von Chloramin-T für intakte Antikörper und Jodogen für Fragmente mit Jod-131 radioaktiv markiert. Nach Reinigung mittels Gelfiltration waren die Antikörperfraktionen chromatographisch frei von J-131. Die in vitro-Immunreaktivität wurde durch Zellautoradiographie und durch Absorptionsstudien bestätigt.

Zur Radioimmundarstellung mittels externer Szintigraphie wurden Nacktmäusen mit i.m. und s.c. Transplantaten verschiedene Aktivitätsmengen an monoklonalen Antikörpern und Fragmenten i.v. injiziert. Tumortragende Kontrolltiere erhielten dieselben Mengen an Maus-IgG. Aufnahmen unmittelbar nach der Verabreichung des intakten Antikörpers (50-100 μ Ci) sowie nach 24, 48, 72 und 96 Stunden zeigten eine klare Lokalisierung des Tumors nach 96 Stunden. Nach Injektion von 150 μ Ci $F(ab')_2$ war der Tumor bereits nach 48 Stunden klar sichtbar. Nach Injektion von unspezifischem Kontroll-IgG konnte keine positive szintigraphische Darstellung des Tumors erzielt werden.

Das biokinetische Verhalten der Antikörper wurde durch Ganzkörpermessungen bestimmt. 50% des intakten Antikörpermoleküls waren nach 96 Stunden ausgeschieden. Die Clearance von Fragmenten und unspezifischem Maus-IgG verlief erheblich schneller mit einer Halbwertszeit von 7-10 Stunden. Die rasche Ausscheidung von Fragmenten aus dem Blutpool führte zu höheren Tumor/Blut-Werten nach 48 Stunden im Ver-

gleich zu intakten monoklonalen Antikörpern. Studien der Gewebsverteilung bestätigten die bevorzugte Tumoraufnahme monoklonaler Antikörper. Die Aktivitäten im Nichttumorgewebe lagen bei Fragmenten niedriger. Mit intakten Antikörpern konnte eine Bindung in Leber, Milz und Lunge beobachtet werden.

Bei Verwendung von 14 AC1-IgG zur Lokalisierung intracerebraler Transplantate konnte eine Anreicherung monoklonaler Antikörper im Tumorgewebe durch Messung der Aktivitätskonzentrationen gezeigt werden.

Die rasche Clearance der Blutpoolaktivität in Verbindung mit höheren Tumoraufnahmeraten bestätigen den Wert monoklonaler Antikörperfragmente für die Diagnostik von Tumoren. Intakte monoklonale Antikörper können aufgrund ihrer längeren Verweilzeit im Körper mögliche Träger für Radioisotope und zytotoxische Substanzen zum Zwecke der Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren bei Tumoren sein.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-81.007.2) durchgeführt.

SUMMARY

RADIOIMMUNOLOCALIZATION OF EXPERIMENTAL GLIOMAS WITH RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES

The biodistribution and tumor uptake of radiolabeled glioma specific monoclonal antibodies (McAb-14AC1) and their $F(ab')_2$ -fragments were investigated in nude mice with xenografts of the experimental rat glioma 79FR-G-41. $F(ab')_2$ -fragments were generated by proteolytic digestion with pepsin. Purified whole McAbs of IgG_{2a}-isotype, fragments and normal murine immunoglobulins were radiolabeled with I 131 using Chloramine-T for intact antibodies and Iodogen for antibody fragments. After separation by gel filtration the antibody fraction was chromatographically free of unbound I 131. The in vitro-immunoreactivity was confirmed with cell autoradiography and absorption studies on the target cell line.

For radioimmunoimaging by external scintigraphy nude mice bearing i.m. and s.c. xenografts were injected intravenously with different activities of I-131-McAbs and their fragments. Control tumor bearing animals received the same amount of I-131-mouse-IgG. Scans obtained immediately after injection of the intact antibody (50 - 100 μ Ci) and at 24, 48, 72 and 96 hours showed clear tumor localization 96 hours p.i.. After injection of 150 μ Ci $F(ab')_2$ -fragments the tumor was already clearly visible at 48 hours p.i.. Injection of unspecific control IgG showed no positive scintigraphic image.

The biokinetic behaviour of the administered antibodies was determined by whole body counting. 50% of the intact McAb were excreted after 96 hours. The clearance of fragments and unspecific murine IgG was considerably faster with a half life of 7-10 hours. The rapid blood clearance of the

antibody fragments lead to increasing tumor-to-blood ratios after 48 hours in comparison with intact IgG. Biodistribution studies confirmed the preferential uptake in the tumor for glioma specific McAbs. The activities of non-tumor tissues were lower for antibody fragments. With intact McAbs a slight unspecific binding in liver, spleen and lung could be observed.

Using ^{14}ACl -IgG to localize intracerebrally transplanted gliomas, it could be shown by tissue activity counting, that grafts are permeable for the McAb.

The rapid clearance of blood pool activity with F(ab')_2 -fragments together with higher tumor uptake ratios indicate the value of antibody fragments for diagnostic purposes. Because of their longer body retention intact McAbs may be possibly carriers for radioisotopes and cytotoxic substances in evaluation of therapeutic approaches.

G. LITERATURVERZEICHNIS

- Aarli, J.A.: The immune system and the nervous system.
J. Neurol. 229, 137-154 (1983)
- Allan, P.M., Garson, J.A., Harper, E.J., Asser, U.,
Coakham, H.B., Brownell, B., Kemshead, J.T.:
Biological characterization and clinical
applications of a monoclonal antibody recognizing an
antigen restricted to neuroectodermal tissues.
Int. J. Cancer 31, 591-598 (1983)
- Ashwood-Smith, M.J.: Preservation of mouse bone marrow at
79° C with dimethylsulfoxide.
Nature (Lond.) 190, 1204-1205 (1961)
- Badger, Ch.C., Krohn, K.A., Peterson, A.V., Shulman,
H., Bernstein, J.D.: Experimental radiotherapy of
murine lymphoma with ¹³¹I-labeled anti-thy 1.1
monoclonal antibody.
Cancer Res. 45, 1536-1544 (1985)
- Ballou, B., Reiland, J., Levine, G., Knowles, B.,
Hakala, T.R.: Tumor location using F(ab')_{2u} from
monoclonal IgM antibody.
J. Nucl. Med. 26, 283-292 (1985)
- Ballou, B., Jaffe, R., Taylor, R.J., Solter, D.,
Hakala, T.R.: Tumor radioimmunolocation:
Differential antibody retention by antigenic normal
tissue and tumor.
J. Immunol. 132, 2111-2115 (1984)
- Bale, W.F., Contreras, M.A., Grady, E.D.:
Factors influencing localization of labeled
antibodies in tumors.
Cancer Res. 40, 2965-2972 (1980)

- Beaumier, P.L., Krohn, K.A., Carrasquillo, J.A., Eary, J.,
Hellström, I., Hellström, K.E., Nelp, W.B.,
Larson, S.M.: Melanoma localization in nude mice
with monoclonal Fab against p97.
J. Nucl. Med. 26, 1172-1179 (1985)
- Berg, D.: Persönliche Mitteilung (1982)
- Bigner, D.D., Bigner, S.H., Ponten, J., Westermarck, B.,
Mahaley, M.S., Ruostathi, E., Herschman, H., Eng,
L.F., Wikstrand, C.F.: Heterogeneity of genotypic
and phenotypic characteristics of fifteen permanent
cell lines derived from human gliomas.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 40, 201-229 (1981)
- Bigner, S.H., Mark, J., Bigner, D.D.: Chromosomal
composition of four permanent cultured cell lines
derived from human gliomas.
Cancer Genet. Cytogenet. 10, 335-339 (1983)
- Bilzer, Th., Stavrou, D., Dahme, E., Anzil, A.P.:
Cell-mediated immune response in rats immunized with
chemically modified syngeneic glioma cells.
Monitoring by in vivo and in vitro immune cytotoxicity.
Anticancer Res. 2, 345-354 (1982)
- Bolton, A.E.: Proteinmarkierungstechniken
Amersham Buchler, Review 18, Braunschweig, 1979
- Bolton, A.E., Hunter, W.M.: The labelling of proteins to a
high specific activity by conjugation to a
¹²⁵I-containing acylating agent.
Biochem. J. 133, 529-538 (1973)

- Bourdon, M.A., Wikstrand, C.J., Furthmayer, H., Matthews, T.J., Bigner, D.D.: Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody.
Cancer Res. 43, 2796-2805 (1983)
- Bourdon, M.A., Coleman, R.E., Blasberg, R.G., Groothuis, D.R., Bigner, D.D.: Monoclonal antibody localization in subcutaneous and intracranial human glioma xenografts: Paired-label and imaging analysis.
Anticancer Res. 4, 133-140, (1984)
- Bradwell, A.R., Fairweather, D.S., Dykes, P.W., Keeling, A., Vaughan, A., Taylor, J.: Limiting factors in the localization of tumours with radiolabelled antibodies.
Immunol. Today 6, 163-170 (1985)
- Buchegger, F., Haskell, Ch.M., Schreyer, M., Scazziga, B.R., Randin, S., Carrel, S., Mach, J.P.: Radiolabeled fragments of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen for localization of human colon carcinoma grafted into nude mice.
J. Exp. Med. 158, 413-427 (1983)
- Buchsbaum, D., Randall, B., Hanna, D., Chandler, R., Loken, M., Johnson, E.: Comparison of the distribution and binding of monoclonal antibodies labeled with ¹³¹I-iodine or ¹¹¹In-indium.
Eur. J. Nucl. Med. 10, 398-402 (1985)
- Bullard, D.E., Bourdon, M., Bigner, D.D.: Comparison of various methods for delivering radiolabeled monoclonal antibody to normal rat brain.
J. Neurosurg. 61, 901-911 (1984)

- Cairncross, J.G., Mattes, M.J., Beresford, H.R., Albino, A.P., Houghton, A.N., Lloyd, K.O., Old, L.J.: Cell surface antigens of human astrocytoma defined by mouse monoclonal antibodies: Identification of astrocytoma subsets.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 5641-5645 (1982)
- Carrel, S., de Tribolet, N., Mach, J.P.: Expression of neuroectodermal antigens common to melanomas, gliomas, and neuroblastomas: I. Identification by monoclonal anti-melanoma and anti-glioma antibodies.
Acta Neuropath.(Berl.) 57, 158-164 (1982)
- Carrasquillo, J.A., Krohn, K.A., Beamier, P., McGuffin, R.W., Brown, J.P., Hellström, K.E., Hellström, I., Larson, S.M.: Diagnosis of and therapy for solid tumors with radiolabeled antibodies and immune fragments.
Cancer Treat. Rep. 68, 317-328 (1984)
- Chatal, J.F., Saccavini, J.C., Fumoleau, P., Douillard, J.Y., Curtet, Ch., Kremer, M., LeMevel, B., Koprowski, H.: Immunoscintigraphy of colon carcinoma.
J. Nucl. Med. 25, 307-314 (1984)
- DiChiro, G., Spar, I.L., Bale, W.F., Loskowski, E.J., Goodland, R.J., Matthews, W.B.: "RIAF" radioiodinated anti-fibrinogen encephalography.
Acta. Radiol. Diagn. 1, 967-971 (1963)
- Ciocca, D.R., Adams, D.J., Bjercke, R.J., Sledge, G.W., Edwards, D.P., Chamness, G.C., McGuire, W.L.: Monoclonal antibody storage conditions, and concentrations effects on immunohistochemical specificity.
J. Histochem. Cytochem. 31, 691-696 (1983)

- Coakham, H.B.: Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.
Nature (Lond.) 250, 328-330 (1974)
- Coakham, H.B., Kornblith, P.L., Quindlen, E.A., Pollock, L.A., Wood, W.C., Harnett, L.C.: Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: In vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays.
J. Natl. Cancer Inst. 64, 223-233 (1980)
- Coakham, H.B.: Immunology of human brain tumors.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20, 145-149 (1984)
- Cole, W., De Nardo, S., Meares, C.: Development of copper-67 chelate conjugated monoclonal antibodies for radioimmunotherapy.
J. Nucl. Med. 24, P30 (1983) (Abstract)
- Colcher, D., Zalutsky, M., Kaplan, W., Kufe, D., Austin, F., Schlom, J.: Radiolocalization of human mammary tumors in athymic mice by a monoclonal antibody.
Cancer Res. 43, 736-742 (1983)
- Colcher, D., Keenan, A.M., Larson, S.M., Schlom, J.: Prolonged binding of a radiolabeled monoclonal antibody (B72.3) used for in situ radioimmuno-detection of human colon carcinoma xenografts.
Cancer Res. 44, 5744-5751 (1984)
- Day, E.D., Planisek, J.A., Pressman, D.: Localization in vivo of radioiodinated anti-rat-fibrin antibodies and radioiodinated rat fibrinogen in the Murphy rat lymphosarcoma and in other transplantable rat tumors.
J. Natl. Cancer Inst. 22, 413-426 (1959)

- Day, E.D., Lassiter, S., Woodhall, B., Mahaley, J.L.,
Mahaley, M.S.: The localization of radioantibodies
in human brain tumors. I. Preliminary exploration.
Cancer Res. 25, 773-778 (1965)
- Dillman, R.O., Beauregard, J.C., Sobol, R.E., Royston, I.,
Bartholomew, R.M., Hagan, P.S., Halpern, S.E.: Lack
of radioimmunodetection and complications associated
with monoclonal anticarcinoembryonic antigen anti-
body cross-reactivity with an antigen on circulating
cells.
Cancer Res. 44, 2213-2218 (1984)
- Doherty, P.W., Hnatowich, D. : Yttrium-90 labeled monoclonal
antibody as a potential agent for radioimmunotherapy.
J. Nucl. Med. 25, P111 (1984) (Abstract)
- Duran-Reynolds, F.: Studies on the localization of dye and
foreign proteins in normal and malignant tissues.
Am. J. Cancer 35, 98-107 (1939)
- Eckelman, W.C., Paik, C.H., Reba, R.C.: Radiolabeling
of antibodies.
Cancer Res. 40, 3036-3042 (1980)
- Epenetos, A.A., Nimmon, C.C., Arklie, J., Elliot, A.T.,
Hawkins, L.A., Knowles, R.W., Britton, K.E., Bodmer,
W.F. : Detection of human cancer in an animal model
using radio-labelled tumor-associated monoclonal
antibodies.
Brit. J. Cancer 46, 1-8 (1982)

Epenetos, A.A., Courtenay-Luck, N., Pickering, D., Hooker, G., Durbin, H., Lavender, J.P., McKenzie, C.G.: Antibody guided irradiation of brain glioma by arterial infusion of radioactive monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor and blood group A antigen.

Brit. Med. J. 290, 1463-1466 (1985)

Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R.: Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein-A-Sepharose.

Immunochem. 15, 429-436 (1978)

Farrands, P.A., Pimm, M.V., Perkins, A.C., Embleton, M.V., Hardy, J.D., Baldwin, R.W., Hardcastle, J.D.: Radioimmunodetection of human colorectal cancers by an anti-tumor monoclonal antibody.

Lancet 2, 397-400 (1982)

Fawwaz, R.A., Wang, T.S.T., Srivasta, S.C.: Potential of Palladium-109 labeled antimelanoma monoclonal antibody for tumor therapy.

J. Nucl. Med. 25, 796-799 (1984)

Fawwaz, R.A., Wang, T.S.T., Estabrook, A., Rosen, J.M., Hardy, M.A., Alderson, Ph.O., Srivasta, S.C., Richards, P., Ferrone, S.: Immunoreactivity and biodistribution of indium-111-labeled monoclonal antibody to a human high molecular weight-melanoma associated antigen.

J. Nucl. Med. 26, 488-492 (1985)

Feindel, W., Yamamoto, Y.L., Rumin, N.: Comparison of radiaktive iodinated serumalbumin (RISA) and radioactive mercury-203 for brain scanning.

J. Neurosurg. 21, 1-6 (1964)

- Fraker, P.J., Speck, J.C.: Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857 (1978)
- Gaffar, M.E., Pant, K.D., Shochat, D., Bennet, S.J., Goldenberg, D.M.: Experimental studies of tumor radioimmunodetection using antibody mixtures against carcinoembryonic antigen (CEA) and colon-specific antigen-p (CSA-p). Int. J. Cancer 27, 101-105 (1981)
- Gansow, O.A., Atcher, R.W., Link, D.C.: Generator-produced Bi-212 chelated to chemically modified monoclonal antibody for use in radiotherapy. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 241, 215-227 (1984)
- Ghose, T., Tai, J., Guclu, A., Norvell, S., MacDonald, A.: Tumor localization of ^{131}I -labeled antibodies by radionuclide imaging. Radiology 116, 445-448 (1975)
- Goding, J.W.: Monoclonal antibodies: Principles and practice. Academic Press, London, 1983
- Goding, J.W.: Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. J. Immunol. Meth. 20, 241-253 (1978)
- Goldenberg, D.M., DeLand, F., Kim, E., Bennet, S., Primus, F.J., van Nagell, J.R., DeSimone, P., Rayburn, P.: Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancer by external photoscanning. N. Engl. J. Med. 298, 1384-1388 (1978)

- Goodwin, D.A., Meares, C.F., McCall, M.J., Haseman, M.K.,
McTigue, M., Diamanti, C.I., Chaovapong, W.: Chelate
conjugates of monoclonal antibodies for imaging
lymphoid structures in the mouse.
J. Nucl. Med. 26, 493-502 (1985)
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.:
The preparation of ^{131}J -labelled human growth
hormone of high specific radioactivity.
Biochem. J. 89, 114-123 (1963)
- Hedin, A., Wahren, B., Hammarström, S.:
Tumor localization of CEA-containing human tumors in
nude mice by means of monoclonal anti-CEA antibodies.
Int. J. Cancer 30, 547-552 (1982)
- Hericourt, J., Richet, C.: Traitment d'un cas de sarcome
par la serotherapie
Cr. Hebd. Seances Acad. Sci. 120, 948-950 (1895)
- Herlyn, D., Powe, J., Alavi, A., Mattis, J.A., Herlyn, M.,
Ernst, C., Vaum, R., Koprowski, H.: Radioimmuno-
detection of human tumor xenografts by monoclonal
antibodies.
Cancer Res. 43, 2731-2735 (1983)
- Hiramoto, R., Yagi, Y., Pressman, D.: In vivo fixation
of antibodies in the adrenal.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 870-874 (1958)
- Hnatowich, D.J., Layne, W.W., Childs, R.L., Lanteigne, D.,
Davis, M.A., Griffin, T.W., Doherty, P.W.:
Radioactive labeling of antibody: A simple and
efficient method.
Science 220, 613-615 (1983)

- Hoffer, P.B., Lathrop, K., Bekerman, C., Fang, V.S.,
Refetoff, S.: Use of ^{131}I -CEA antibody as a tumor
scanning agent.
J. Nucl. Med. 15, 323-327 (1974)
- Houston, L.L., Nowinski, R.C., Bernstein, I.D.: Specific
in vivo localisation of monoclonal antibodies
directed against the Thy 1.1 antigen.
J. Immunol. 125, 837-843 (1980)
- Jones, D.H., Goldman, A., Gordon, I., Pritchard, J.,
Gregory, B.J., Kemshead, J.T.: Therapeutic
application of a radiolabelled monoclonal antibody
in nude mice xenografted with human neuroblastoma:
Tumoricidal effects and distribution studies.
Int. J. Cancer 35, 715-720 (1985)
- Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.:
A new mouse myeloma cell line that has lost immuno-
globulin expression but permits the construction of
antibody-secreting hybridoma cell lines.
J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)
- Keenan, A.M., Colcher, D., Larson, S.M., Schlom, J.:
Radioimmunosintigraphy of human colon cancer
xenografts in mice with radioiodinated monoclonal
antibody B 72.3.
J. Nucl. Med. 25, 1197-1203 (1984)
- Keenan, A.M., Harbert, J.C., Larson, S.M.:
Monoclonal antibodies in nuclear medicine.
J. Nucl. Med. 26, 531-537 (1985)

- Kennet, R.H., Gilbert, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against human neuroblastoma antigen present on fetal brain.
Science 203, 1120-1121 (1979)
- Kemshead, R.H., Fritschy, J., Garson, J.A.: Monoclonal antibody UJ 127.11 detects a 220-240.000 kdal. glycoprotein present on subsets of neuroectodermally derived cells.
Int. J. Cancer 31, 187-192 (1983)
- Khaw, B.A., Strauss, H.W., Cahill, S.L., Soule, H.R., Edgington, T., Cooney, J.: Sequential imaging of indium-111-labeled monoclonal antibody in human mammary tumors hosted in nude mice.
J. Nucl. Med. 25, 592-603 (1984)
- Kim, E.E., DeLand, F.H., Nelson, M.O., Bennet, S., Simmons, G., Alpert, E.: Radioimmuno-detection of cancer with radiolabeled antibodies to alpha-fetoprotein.
Cancer Res. 40, 3008-3012 (1980)
- Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature (Lond.) 256, 495-497 (1975)
- Kornblith, P.L., Dohan, F.C., Wood, W.C., Whiteman, B.O.: Human astrocytoma: Serum mediated immunologic response.
Cancer 33, 1512-1519 (1974)
- Korngold, L., Pressman, D.: The in vivo purification of tissue localizing antibodies.
J. Immunol. 71, 1-5 (1953)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.

Nature (Lond.) 227, 680-685 (1970)

Lamoyi, E., Nisonoff, A.: Preparation of F(ab')₂ fragments from mouse IgG of various subclasses.

J. Immunol. Meth. 56, 235-243 (1983)

DeLand, F.H., Kim, E.E., Simmons, G., Goldenberg, D.M.: Imaging approach in radioimmunodetection.

Cancer Res. 40, 3046-3049 (1980)

Larson, S.M., Carrasquillo, J.A., Krohn, K.A., Brown, J.P., McGuffin, R.W., Ferens, J.M., Graham, M.M., Hill, L.D., Beaumier, P.L., Hellström, K.E., Hellström, I.: Localisation of ¹³¹I-labeled p97-specific Fab fragments in human melanoma as a basis for radiotherapy.

J. Clin. Invest. 72, 2101-2114 (1983)

Larson, S.M., Brown, J.P., Wright, P.W., Carrasquillo, J.A., Hellström, I., Hellström, K.E.: Imaging of melanoma with I ¹³¹-labelled monoclonal antibodies.

J. Nucl. Med. 24, 123-129 (1984)

Larson, S.M.: Radiolabeled monoclonal anti-tumor antibodies in diagnosis and therapy.

J. Nucl. Med. 26, 538-545 (1985)

De Leij, L., Poppema, S., The, T.H.: Cryopreservation of newly formed hybridomas.

J. Immunol. Meth. 62, 69-72 (1983)

- Lemke, H., Hämmerling, G.J., Höhmann, C., Rajewsky, K.:
Hybrid cell lines secreting monoclonal antibody
specific for major histocompatibility antigens of
the mouse.
Nature (Lond.) 271, 249-251 (1978)
- Levine, G., Ballou, B., Reiland, J., Solter, D.,
Gumerman, L., Hakala, T.: Localization of
I-131-labeled tumor-specific monoclonal antibody in
the tumor-bearing Balb/c mouse.
J. Nucl. Med. 21, 570-573 (1980)
- Mach, J.P., Carrel, S., Merenda, C., Sordat, B.,
Ceroltini, J.C.: In vivo localization of
radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen
in human colon carcinoma grafted into nude mice.
Nature (Lond.) 248, 704-706 (1974)
- Mach, J.P., Forni, M., Ritschard, J., Buchegger, F.,
Carrel, S., Widgren, S., Donath, A., Alberto, P.:
Use and limitations of radiolabelled anti-CEA
antibodies and their fragments for photoscanning
detection of human colorectal carcinomas.
Oncodev. Biol. Med. 1, 49-69 (1980a)
- Mach, J.P., Carrel, S., Forni, M., Ritschard, S., Donath,
A., Alberto, P.: Tumor localization of radiolabeled
antibodies against carcinoembryonic antigen in
patients with carcinoma.
N. Engl. Med. 303, 5-10 (1980b)

Mach, J.P., Buchegger, F., Forni, M., Ritschard, J., Berche, C., Lumbroso, J.D., Schreyer, M., Girardet, C., Accolla, R.S., Carrel, S.: Use of radiolabelled monoclonal anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy.

Immunol. Today 2, 239-249 (1981)

Mahaley, M.S., Mahaley, J.L., Day, E.D.: The localization of radioantibodies in human brain tumors. II. Radioautography.

Cancer Res. 25, 779-793 (1965)

Mahaley, M.S. : Immunological aspects of the growth and development of human and experimental brain tumors. The Experimental Biology of Brain Tumors
Thomas, Springfield, 1972

Marrack, D., Kubala, M., Corey, P., Leavens, M., Howze, J., Dewey, W., Bale, W.F., Spar, I.L.: Localization of intracranial tumors: comparative study with ^{131}I -labeled antibody to human fibrinogen and neohydrin- ^{203}Hg .

Cancer 20, 751-755 (1967)

Martin-Achard, A., Diserens, A.C., de Tribolet, N., Carrel, S.: Evaluation of the humoral response of glioma patients to a possible tumor-associated antigen(s).

Int. J. Cancer 25, 219-223 (1980)

Marchalonis, J.J.: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.

Biochem. J. 113, 299-305 (1969)

McKearn, T.J.: Method for growing hybridomas in rats or mice.

Kennet, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)
Monoclonal antibodies
Plenum Press, New York and London, 1980

McFarlane, A.S.: Efficient trace-labelling of proteins with iodine.

Nature (Lond.) 182, 53-55 (1958)

McCardle, R.J., Harper, P.V., Spar, I.L., Bale, W.F., Andros, G., Jiminez, F.: Studies with iodine-131-labeled antibody to human fibrinogen for diagnosis and therapy of tumors.

J. Nucl. Med. 7, 837-847 (1966)

Midoux, P., Maillet, T., Therain, F., Monsigny, M., Roche, A.C.: Tumor localization of Lewis lung carcinoma with radiolabeled monoclonal antibodies.

Cancer Immunol. Immunother. 18, 19-23 (1984)

Moshakis, V., Bailey, M.J., Ormerod, M.G., Westwood, J.H., Neville, A.M.: Localization of human breast-carcinoma xenografts using antibodies to carcino-embryonic antigen.

Br. J. Cancer 43, 575-581 (1981a)

Moshakis, V., McIlhinney, R.A.J., Neville, A.M.: Cellular distribution of monoclonal antibody in human tumors after i.v. administration.

Br. J. Cancer 44, 663-669 (1981b)

Morantz, R.A., Wood, G.W., Foster, M., Clark, M., Gallahon, K.: Macrophages in experimental and human brain tumors. Part I: Studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity.

J. Neurosurg. 50, 298-304 (1979)

Moldofsky, P.J., Powe, J., Mulhern, C.B., Hammond, N.,
Sears, H.F., Gatenby, R.A., Steplewsky, Z.,
Koprowski, H.: Metastatic colon carcinoma detected
with radiolabeled F(ab')₂ monoclonal antibody
fragments.

Radiology 149, 549-555 (1983)

Murray, J.L., Rosenblum, M.G., Sobol, R.E., Bartholomew,
R.M., Plager, C.E., Haynie, T.P., Jahns, M.F.,
Glenn, H.J., Lamki, L., Benjamin, R.S.,
Papadopoulos, N., Boddie, A.W., Frincke, J.M.,
David, G.S., Carlo, D.J., Hersh, E.M.:
Radioimmunoimaging in malignant melanoma with
¹¹¹In-labeled monoclonal antibody 96.5.

Cancer Res. 45, 2376-2381 (1985)

DeNardo, G.L., DeNardo, S.J., Miyao, N.P., Peng, J.S.,
Epstein, A.L., Cardiff, R.D.: Effect of chloramine-T
labeling conditions on the stability of monoclonal
antibodies and their fragments.

J. Nucl. Med. 26, P45 (1985) (Abstract)

Neville, A.M., Gusterson, B.A.: Monoclonal antibodies and
human tumors: Pathological and clinical aspects.

Eur. J. Cancer Clin. Onc. 21, 355-369 (1985)

Nexø, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus using
enzyme-coupled antibodies.

Virology 77, 849-852 (1977)

Nisonoff, A., Markus, G., Wissler, F.C.: Separation of
univalent fragments of rabbit antibody by reduction
of a single, labile disulphide bond.

Nature (Lond.) 189, 293-295 (1961)

- Ouchterlony, Ö.: Diffusions-in-gel-methods for immunological analysis II.
Progr. Allergy 6, 30-154 (1962)
- Pateraki, E., Guesdon, J.L., Serie, C., Avrameas, S.:
TERELISA: the Elisa-test performed in terasaki plates.
J. Immunol. Meth. 46, 361-368 (1981)
- Paul, J.: Zell- und Gewebekulturen.
De Gruyter, New York - Berlin, 1980
- Perkins, A.C., Whalley, D.R., Hardy, J.G.: Physical approach for the reduction of dual radionuclide image subtraction artefacts in immunoscintigraphy.
Nucl. Med. Commun. 5, 501-512 (1984)
- Perkins, A.C., Pimm, M.V., Birch, M.K.:
The preparation and characterisation of ¹¹¹In-labelled 791T/36 monoclonal antibody for tumor immunoscintigraphy.
Eur. J. Nucl. Med. 10, 296-301 (1985)
- Pennisi, F., Rosa, U.: Preparation of radioiodinated insulin by constant current electrolysis.
J. Nucl. Biol. Med. 13, 64-70 (1969)
- Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Oettgen, H.F., Ransohoff, J., Old, L.J.: Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 5122-5126 (1978)
- Phillips, J., Alderson, T., Sikora, K., Watson, J.:
Localisation of malignant glioma by a radiolabelled human monoclonal antibody.
J. Neurol. Neurosurg. Psych. 46, 388-392 (1983).

- Piguet, V., Diserens, A.C., Carrel, S., Mach, J.P.,
de Tribolet, N.: The immunobiology of human gliomas
Springer Semin. Immunopathol. 8, 111-127 (1985).
- Pimm, M.V., Embleton, M.J., Perkins, A.C., Price, M.R.,
Robins, R.A., Robinson, G.R., Baldwin, R.W.: In vivo
localization of anti-osteogenic sarcoma 791T
monoclonal antibody in osteogenic sarcoma xenografts.
Int. J. Cancer 30, 75-85 (1982)
- Pimm, M.V., Baldwin, R.W.: Quantitative evaluation of the
localization of a monoclonal antibody (791T/36) in
human osteogenic sarcoma xenografts.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20, 515-524 (1984)
- Pimm, M.V., Armitage, N.C., Perkins, A.C., Smith, W.,
Baldwin, R.W.: Localization of an anti-CEA
monoclonal antibody in colo-rectal carcinoma
xenografts.
Cancer Immunol. Immunother. 19, 8-17 (1985a)
- Pimm, M.V., Perkins, A.C., Armitage, N.C., Baldwin, R.W.:
Lokalization of anti-osteogenic sarcoma monoclonal
antibody 791T/36 in a primary human osteogenic
sarcoma and its subsequent xenograft in
immunodeprived mice.
Cancer Immunol. Immunother. 19, 18-21 (1985b)
- Pimm, M.V., Perkins, A.C., Armitage, N.C., Baldwin, R.W.:
The characteristics of blood-borne radiolabels and
the effect of anti-mouse IgG antibodies on
localization of radiolabeled monoclonal antibody in
cancer patients.
J. Nucl. Med. 26, 1011-1023 (1985c)

- Posner, M.R., Antoniou, D., Griffin, J., Schlossman, S.F., Lazarus, H.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells. J. Immunol. Meth. 48, 23-31 (1982).
- Powe, J., Pak, K.Y., Paik, C.H., Steplewski, Z., Ebbert, M.A., Herlyn, D., Ernst, C., Alavi, A., Eckelman, W.C., Reba, R.C., Koprowski, H.: Labeling monoclonal antibodies and F(ab')₂-fragments with (¹¹¹In) indium using cyclic DTPA anhydride and their in vivo behavior in mice bearing human tumor xenografts. Cancer Drug Delivery 1, 125-135 (1984)
- Pressman, D., Keighley, G.: The zone of activity of antibodies as determined by the use of radioactive tracers; the zone of activity of nephrotoxic antikidney serum. J. Immunol. 59, 141-146 (1948)
- Pressman, D.: The zone of localization of antibodies. IV. The in vivo disposition of anti-mouse-kidney serum and anti-mouse-plasma serum as determined by radioactive tracers. J. Immunol. 63, 375-388 (1949a)
- Pressman, D.: The zone of activity of antibodies as determined by the use of radioactive tracers. Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA) 11, 203-206 (1949b)
- Pressman, D., Korngold, L.: The in vivo localization of anti-Wagner-osteogenic-sarcoma antibodies. Cancer 6, 619-623 (1953)

- Pressman, D., Day, E.D., Blaum M.: The use of paired labeling in the determination of tumor-localizing antibodies.
Cancer Res. 17, 845-850 (1957)
- Pressman, D.: The development and use of radiolabeled antitumor antibodies.
Cancer Res. 40, 2960-2964 (1980)
- Primus, F.J., Wang, R.H., Goldenberg, D.M., Hansen, H.J.: Localization of GW-39 human tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to caryinoembryonic antigen.
Cancer Res. 33, 2977-2983 (1973)
- Primus, F.J., MacDonald, R., Goldenberg, D.M., Hansen, H.J.: Localization of GW-39 human tumors in hamsters by affinity-purified antibody to carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 37, 1544-1547 (1977)
- Reynolds, J., Fejka, R., Rotman, M., Farkas, R., Larson, S.: Loss of immunoreactivity of I-131 labelled monoclonal antibody with storage is related to radiation damage.
J. Nucl. Med. 26, P113 (1985) (Abstract)
- Rhodes, B.A., Tarvestad, D.A., Bieslow, K.: ^{99m}Tc labeling and acceptance testing of radiolabeled antibodies and antibody fragments.
In: Tumor Imaging; Burchiel, S.W., Rhodes, B.A. (eds.) Masson Publishing, New York, 1982
- Rollo, F.D., Patton, J.A.: Imaging techniques for the radioimmunodetection of cancer.
Cancer Res. 40, 3050-3053 (1980)

Scheinberg, D.A., Strand, M., Gansow, O.A.: Tumor imaging with radioactive metal chelates conjugated to monoclonal antibodies.

Science 215, 1511-1513 (1982a)

Scheinberg, D.A., Strand, M.: Leukemic cell targeting and therapy by monoclonal antibody in a mouse model system.

Cancer Res. 42, 44-49 (1982b)

Scheinberg, D.A., Strand, M.: Kinetic and catabolic considerations of monoclonal antibody targeting in erythroleukemic mice.

Cancer Res. 43, 265-272 (1983)

Schnegg, F.J., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Martin-Achard, A., Carrel, S.: Characterization of a rabbit anti-human malignant glioma antiserum.

Int. J. Cancer 28, 265-269 (1981a)

Schnegg, F.J., Diserens, A.C., Carrel, S., Accolla, R.S., de Tribolet, N.: Human glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 14, 1209-1213 (1981b)

Schold, S.C., Rawling, Ch.E., Bigner, S.H., Bigner, D.D.: Intracerebral growth of a human glioma tumor line in athymic mice and treatment with procarbazine, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea, aziridinyl-benzoquinone and cis-platinum.

Neurosurg. 12, 672-677 (1983)

Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.: Common antigenetic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies.

Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

Senekowitsch, R., Baum, R.P., Maul F.D., Wenisch, H.J.C.,
Mollenstädt, S., Kriegel, H., Hör, G.: Biokinetische
Studien zur szintigraphischen Darstellung xeno-
transplanterter menschlicher Pankreaskarzinome mit
 ^{131}J od markierten F(ab')_2 -Fragmenten verschie-
dener monoklonaler Antikörper.

Nuc. Compact 16, 414-419 (1985)

Sfakianakis, G.N., DeLand, F.H.: Radioimmundiagnosis and
radioimmunotherapy.

J. Nucl. Med. 23, 840-850 (1982)

Sheikh, K.M., Apuzzo, M.L., Kochsiek, K.R., Weiss, M.H.:
Malignant glial neoplasms: Definition of a humoral
host response to tumor-associated antigen(s).

Yale J. Biol. Med. 50, 397-403 (1977)

Shapiro, W.R., Basler, G.A., Chernik, N.L., Posner, J.B.:
Human brain tumor transplantation into nude mice.

J. Natl. Cancer Inst. 62, 447-453 (1979)

Shapiro, J.R., Jung, W.A., Shapiro, W.R.: Isolation,
karyotype and clonal growth of heterogenous
subpopulations of human malignant gliomas.

Cancer Res. 41, 23-59 (1981)

Sikora, K., Alderson, Th., Phillips, J., Watson, J.V.:
Human hybridomas from malignant gliomas.

Lancet 2, 11-14 (1982)

Sikora, K.: The characterisation of gliomas using human
monoclonal antibodies.

Exp. Cell. Biol. 52, 189-195 (1984)

- Smedley, H.M., Finan, P., Lennox, E.S., Ritson, A., Takei, F., Wraight, P., Sikora, K.: Localisation of metastatic carcinoma by a radiolabelled monoclonal antibody.
Br. J. Cancer 47, 253-259 (1983)
- Spar, I.L., Goodland, R.L., Bale, W.F.: Localization of ^{131}I -labeled antibody to rat fibrin in a transplantable rat lymphosarcoma.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 259-262 (1959)
- Spence, A.M., Hellström, K.E., Hellström, I., v. Belle, G., Sullivan, K., Wahlström, T.: Immunisation against ethylnitrosourea induced autochthonous neurogenic rat tumors.
Brit. J. Cancer 40, 164-167 (1979)
- Stavrou, D., Elling, H., Osterkamp, U.: Zytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome.
Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)
- Stavrou, D., Hultèn, M., Anzil, A.P., Bilzer, Th.: The humoral antibody response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.
Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)
- Stavrou, D., Bilzer, Th., Hultèn, M., Zänker, K.S., Anzil, A.P., Haglid, K.G., Dahme, E.: Immunological aspects of experimental brain tumors.
Anticancer Res. 2, 151-155 (1982)
- Stavrou, D., Süss, C., Bilzer, Th., Kummer, U., deTribolet, N.: Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines derived from experimental brain tumors.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449 (1983)

Stavrou, D., Mellert, W., Bilzer, Th., Senekowitsch, R.,
Keiditsch, E., Mehraein, P.: Radioimmunodetection of
gliomas by administration of radiolabelled
monoclonal antibodies. Experimental data.
Anticancer Res. 5, 147-156 (1985)

Stuhlmiller, G.M., Sullivan, D.C., Vervaert, C.E., Croker,
B.P., Harris, C.C., Seigler, H.F.: In vivo tumor
localization using tumor-specific monkey
xenoantibody, alloantibody, and murine monoclonal
xenoantibody.
Ann. Surg. 194, 592-600 (1981)

Symonds, E.M., Perkins, A.C., Pimm, M.V., Baldwin, R.W.,
Mapdy, J.G., Williams, D.A.: Clinical implications
for immunoszintigraphy in patients with ovarian
malignancy: a preliminary study using monoclonal
antibody 791/36.
Br. J. Obst. Gyn. 92, 270-276 (1985)

Tamanoi, I., Yagi, Y., Hiramoto, R., Pressman, D.: Lung
localizing antibodies in anti-lung and anti-kidney
serum.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 661-663 (1961)

Tho, B.H., Guli, E.P.G.: In vitro immunoreactivity against
ethylnitrosurea induced tumors of the nervous system
in rat.
Experientia 30, 1472-1473 (1974)

Trouillas, P.: Carcinofetal antigen in rat glial tumors.
Lancet 2, 552 (1971)

- Wahl, C.R., Parker, C.W., Philpott, G.W.: Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')₂.
J. Nucl. Med. 24, 316-325 (1983)
- Wahl, R.L., Laino., Jackson, C., Fisher, S., Beierwaltes, W.H.: Influence of unlabelled monoclonal anti-mouse antibody on the clearance rate of radiolabelled mouse monoclonal antibody.
J. Nucl. Med. 26, 66 (Abstract) (1985)
- Wahlström, T., Saksela, E., Troupp, H.: Cell bound antiglial immunity in patients with malignant tumors of the brain.
Cell Immunol. 6, 161-170 (1973)
- Wahlström, T., Linder, E., Saksela, E., Westermarck, B.: Tumor specific membrane antigens in established cell lines from gliomas.
Cancer 34, 274-279 (1974)
- Walker, M.D., Alexander, E., Hunt, W.E., MacCarty, C.S., Mahaley, M.S., Mealey, J., Norrell, H.A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, Ch.B., Gehan E.A., Strike, T.A.: Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas.
J. Neurosurg. 49, 333-343 (1978)
- Weinstein, J.N., Steller, M.A., Keenan, A.M., Covell, D. G., Key, M.E., Sieber, S.M., Oldham, R.K., Hwang, K.M., Parker R.J.: Monoclonal antibodies in the lymphatics: Selective delivery to lymph node metastases of a solid tumor.
Science 222, 423-426 (1983)

Wikstrand, C.J., Mahaley, M.S., Bigner, D.D.: Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.

Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Surface antigens of human glioma cells shared with normal and fetal brain.

Cancer Res. 39, 3235-3243 (1979)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 42, 267-275 (1982)

Wikstrand, C.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D.: Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 3327-3334 (1983)

Wilbanks, T., Peterson, J.A., Miller, S., Kaufmann, L., Ortendahl, D., Ceriani, R.L.: Localization of mammary tumors in vivo with ¹³¹I-labelled Fab fragments of antibodies against mouse mammary epithelial (MME) antigens.

Cancer 48, 1768-1775 (1981)

Woosley, R.E., Mahaley, M.S., Mahaley, J.L., Miller, G.M., Brooks, W.H.: Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 3: Microcytotoxicity assays of specific response of brain tumor patients.

J. Neurosurg. 47, 871-885 (1977)

Yeh, M.Y., Hellström, I., Hellström, K.E.: Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.

J. Immunol. 126, 1312-1317 (1981)

Zimmer, A.M., Rosen, S.T., Spies, S.M., Polovina, M.R., Minna, J.D., Spies, W.C., Silverstein, E.A.: Radioimmunoimaging of human small cell lung carcinoma with ^{131}I tumor specific monoclonal antibody.

Hybridoma 4, 1-11 (1985)

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou danke ich sehr für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Kriegel danke ich sehr für die Möglichkeit in seiner Abteilung alle Versuche mit radioaktiv markierten Antikörpern durchführen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau D. Wallmann, Frl. G. Boie und Frau A. Lechner, die mir bei der Durchführung vieler Experimente eine große Hilfe waren.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. R. Senekowitsch, Frau S. Möllenstädt sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche in der Abt. für Nuklearbiologie.

Lebenslauf

Name	Hubert Glässner
geb. am	3.12.1957
in	Bad Reichenhall
Staatsangeh.	deutsch
Schulbesuch	1964-1968 Volksschule Freilassing 1968-1977 Gymnasium Laufen 24.6.1977 Abitur
Fachausbildung	1977-1978 Studium der Landwirtschaft an der Technischen Universität München- Weihenstephan 1978-1984 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München 28.2.1984 Tierärztliche Prüfung bestanden 30.3.1984 Approbation seit 15.10.1984 Anstellung als wissen- schaftlicher Mitarbeiter an der Abt. für Nuklearbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung m.b.H. in Neuherberg

